Universitätsklinikum Ulm
Klinik für Neurologie
Ärztlicher Direktor: Prof. Dr. med. A. C. Ludolph

Gelsolin als möglicher Biomarker bei Patienten mit Multipler Sklerose

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Universität Ulm

vorgelegt von

Rümeysa Haas, geb. Kalkan
aus Ulm

2017

Amtierender Dekan:	Prof. Dr. rer. nat. Thomas Wirth
1. Berichterstatter:	Prof. Dr. med. Hayrettin Tumani
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. med. Daniel Walcher
Tag der Promotion:	14.12.2018

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis III

1. Einleitung 1

1.1 Multiple Sklerose 1

1.1.1 CIS und RRMS 1

1.1.2 Etablierte und relevante klinische Parameter 2

1.2 Gelsolin 4

1.2.1 Zytosolisches Gelsolin 6

1.2.2 Plasmatisches Gelsolin 6

1.3 Klinische Aspekte von Gelsolin 8

1.4 Gelsolin und MS 8

1.5 Ziel und Fragestellung der vorliegenden Arbeit 9

2. Material und Methoden 11

2.1 Patientengut 11

2.1.1 Ein- und Ausschlusskriterien 12

2.2 Erhobene Daten 13

2.2.1 Allgemeine Daten 13

2.2.2 Daten im zeitlichen Verlauf 15

2.3 MRT-Befunde 15

2.3.1 Durchführung der MRT-Bildgebung 15

2.3.2 Auswertung der cMRT-Bildgebungen 16

2.4 EDSS 17

2.5 Messung der Gelsolinkonzentration 18

2.5.1 ELISA 18

2.5.2 Materialien 19

2.5.3 Testablauf 21

2.5.4 Validierung des Gelsolin-ELISA 25

2.5.5 Auswertung der Ergebnisse 26

2.6 Statistische Analyse 27

3. Ergebnisse 28

3.1 Validierung des Gelsolin-ELISA 28

3.1.1 Wiederfindung 28

3.1.2 Linearität 29

3.2 Relevante Patientendaten 30

3.3 Routinediagnostik des Liquors 32

3.4 Vergleich der Gelsolinkonzentration bei CIS- und MS-Patienten 33

3.5 Zusammenhang zwischen dem EDSS und der Gelsolinkonzentration 37

3.6 Zusammenhang zwischen T2-Läsionen und der Gelsolinkonzentration 39

3.7 Zusammenhang zwischen einem Schub und der Gelsolinkonzentration 41

3.8 Zusammenhang zwischen einer immunmodulierenden Therapie und der Gelsolinkonzentration 43

3.9 Zusammenhang zwischen der Krankheitsdauer und der Gelsolinkonzentration 45

4. Diskussion 51

4.1 Diskussion der Methodik 51

4.2 Zusammenhang zwischen dem EDSS und der Gelsolinkonzentration 57

4.3 Zusammenhang zwischen T2-Läsionen und der Gelsolinkonzentration 58

4.4 Gelsolinkonzentration bei einem Schub im Vergleich zum schubfreien Intervall und im zeitlichen Verlauf 59

4.5 Zusammenhang zwischen einer immunmodulierenden Therapie und der Gelsolinkonzentration 61

5. Zusammenfassung 65

6. Literaturverzeichnis 67

Danksagung 73

Lebenslauf 74

Abkürzungsverzeichnis

ARDS	Acute Respiratory Distress Syndrome
BSA	Bovine Serum Albumin
CIS	Klinisch isoliertes Syndrom Clinically Isolated Syndrome
CSF	Cerebrospinale Flüssigkeit
cMRT	Zerebrale Magnetresonanztomographie
ddH_2O	Bisdestiliertes Wasser
EASS	Extracellular Actin Scavenging System
EDSS	Expanded Disability Status Scale
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
Gc-Globulin	Group-specific component Globulin
i.m.	Intramuskulär
HRP	Horseradish Peroxidase
Ig	Immunglobulin
kDa	Kilodalton
mRNA	Messenger RNA
MRT	Magnetresonanztomographie
MS	Multiple Sklerose
OKB	Oligoklonale Banden
PBS	Phosphate Buffered Saline
PIP2	Phosphatidylinositol- Bisphosphat
Q_{Alb}	Albuminquotient
RKU	Rehabilitationskrankenhaus Ulm
RRMS	Schubförmig remittierende Multiple Sklerose Relapsing Remitting Multiple Sclerose

S1P	Sphingosin-1-Phosphat
s.c.	subcutan
TBS	Tris Buffered Saline
TMB	Tertramethylbenzidin
ZNS	Zentrales Nervensystem

1. Einleitung

1.1 Multiple Sklerose

Die Multiple Sklerose (MS) ist gekennzeichnet durch eine Entzündung und eine daraus folgende chronische Degeneration des Zentralen Nervensystems (ZNS) (Tremlett H et al. 2010). Hierbei kann es zur Demyelinisierung und zu einer axonalen Schädigung im gesamten Zentralen Nervensystem kommen (Patti F u. Vila C 2014). Die Symptome können sehr unterschiedlich sein, je nachdem wo sich die Demyelinisierung abspielt (Selchen D et al. 2012).
Frauen erkranken etwa doppelt so häufig wie Männer an einer MS, vor allem zwischen dem 20. und 40. Lebensjahr (Merkelbach S et al. 2000).

Es gibt unterschiedliche Verlaufsformen einer MS. Die häufigste Erstmanifestation ist das klinisch isolierte Syndrom (CIS) (Miller DH et al. 2004). Als häufigste Erstsymptome treten Sensibilitätsstörungen und einseitige Optikusneuritiden auf (Weinshenker 1998). In 50-60 % der Fälle geht ein CIS in eine schubförmig remittierende MS (RRMS) über (Miller DH et al. 2004).

1.1.1 CIS und RRMS

CIS

Tritt eine Demyelinisierung als klinisch isoliertes Ereignis auf, spricht man von einem CIS. Es geht oft mit einer Optikusneuritis, Myelitis oder einem Hirnstammsyndrom einher, ohne dass die zeitliche und räumliche Dissemination erfüllt ist, die zur Diagnosestellung der MS benötigt wird (Selchen D et al. 2012). 2003 hatten Tintore M et al. schon erkannt, dass bei Auftreten von multifokalen Läsionen in der Magnetresonanztomographie (MRT) oder von liquorspezifischen oligoklonalen Banden (OKB) bei einem CIS, sich das Risiko für einen schnelleren Übergang zu einer MS erhöht (Tintore M et al. 2003). Brettschneider J et al., zeigten 2006 anhand erhöhter Neurofilamentspiegel im Liquor, dass es bei einem CIS auch zu einer axonalen Schädigung kommt und somit eine Nervenschädigung bereits in sehr frühen Phasen der MS entsteht (Brettschneider J et al. 2006).

RRMS

Die RRMS ist die häufigste Verlaufsform der MS. 80-90 % der an MS-Erkrankten haben zu Beginn ihrer Erkrankung diese Verlaufsform (Tremlett H et al. 2010). Von einer RRMS spricht man, wenn für mindestens 24 Stunden eine subjektive (anamnestische) oder objektive Funktionsstörung des ZNS vorhanden ist, ohne Zeichen eines Infektes oder Fiebers. Um von einem erneuten Schub sprechen zu können, müssen mindestens 30 Tage vom Beginn des ersten bis zum Beginn des zweiten Ereignisses verstrichen sein. Verschwinden die Symptome, bezeichnet man dies als Remission (Schumacher Ga et al. 1965; Poser CM et al. 1983; McDonald WI et al. 2001). Außerdem müssen die Schübe eindeutig voneinander abgrenzbar sein und vollständig remittieren oder partielle Residuen aufweisen. In den Schubintervalle*n* kommt es zu keiner Krankheitsprogression (Scott 2013).

1.1.2 Etablierte und relevante klinische Parameter

MRT und Diagnose

Um die Diagnose einer MS stellen zu können, bedarf es zunächst einer ausführlichen Anamnese, um zurückliegende neurologische Symptome, die auf einen Schub hinweisen könnten, zu eruieren. Die MRT-Aufnahmen werden nach den Gesichtspunkten der zeitlichen und räumlichen Dissemination bewertet. Hierzu werden die aktuellen McDonald-Kriterien 2010 genutzt (Polman CH et al. 2011a; Polman CH et al. 2011b).

Liquordiagnostik

Eine Lumbalpunktion sollte ebenfalls erfolgen, um cerebrospinale Flüssigkeit (CSF) zu erhalten. Hierbei spielen die OKBs eine wichtige Rolle, da diese als Zeichen einer intrathekalen Antikörperproduktion von IgG gesehen werden kann und bei 98 % aller MS-Patienten zu finden sind (Reiber H et al. 1998).

Darüber hinaus ist die Liquordiagnostik wichtig und hilfreich um andere neurologische Erkrankungen durch charakteristische Veränderungen der Liquorzusammensetzung differentialdiagnostisch zu erfassen (Tumani et al. 2009).

Expanded Disabiltiy Status Scale (EDSS)

Der EDSS ist ein etabliertes Verfahren, um den Behinderungsgrad bei der MS zu erfassen. Dadurch kann eine klinische Verlaufsbeurteilung erfolgen (Kurtzke 1983).

Schub bei RRMS

Von einem Schub spricht man, wenn für mindestens 24 Stunden eine subjektive (anamnestische) oder objektive Funktionsstörung des ZNS vorhanden ist, ohne Zeichen eines Infektes oder Fiebers. Um von einem erneuten Schub sprechen zu können, müssen mindestens 30 Tage vom Beginn des ersten bis zum Beginn des zweiten Ereignisses verstrichen sein. Verschwinden die Symptome, bezeichnet man dies als Remission (Schumacher Ga et al. 1965; Poser CM et al. 1983; McDonald WI et al. 2001)

Langzeitfolgen der MS

Bereits in sehr frühen Stadien der MS kommt es zu einer axonalen Schädigung (Filippi et al. 2003). Sie ist die Hauptursache für bleibende Behinderungen bei Patienten mit einer MS (Dutta u. Trapp 2007). Die häufigsten Symptome im chronischen Verlauf der Erkrankung sind Spastik, Fatigue, Blasenfunktionsstörung, sexuelle Funktionsstörung, Schmerzen und kognitive Dysfunktion (Crayton H et al. 2004). Um Langzeitfolgen zu verhindern, spielen immunmodulierende Therapien eine wichtige Rolle (Lassmann et al. 2001).

Ätiologie

Die Ätiologie der MS ist weitestgehend noch ungeklärt. Die Erkrankung wird als T-Zell-vermittelte Autoimmunerkrankung gesehen, bei der autoaggressive T-Zellen Makrophagen aktivieren und dadurch zytotoxische Mediatoren freigesetzt werden. Ebenfalls kommt es zu einer Komplementaktivierung, einer B-Zell-Aktivierung und einer Aktivierung von zytotoxischen T-Zellen. Dies führt insgesamt zu einer Demyelinisierung im ZNS (Hartung HP et al. 1995; Hohlfeld 1997; Hemmer B et al. 2002).

1.2 Gelsolin

Gelsolin ist ein Kalzium abhängiges Aktin-bindendes Protein, welches sowohl beim Aufbau als auch beim Abbau von Aktinfilamenten beteiligt ist. Es ist in der Lage Aktinfilamente zu zerteilen, durch „Capping“ eine weitere Polymerisation zu verhindern und durch Nukleation von Aktinfilamenten den Ausgangspunkt der Polymerisation zu ermöglichen (Li GH et al. 2012; Bryan J u. Kurth MC 1984).

Struktur

Gelsolin wurde 1979 als ein hitzelabiles Protein im Zytoplasma von Kaninchen-Makrophagen entdeckt (Yin HL u. Stossel TP 1979). Es besteht aus sechs homologen Domänen. Sie werden als G1 bis G6 bezeichnet und weisen ein N-terminales Ende (G1-3) sowie ein C-terminales Ende (G4-6) auf (Nag S et al. 2013). Jede dieser Domänen besteht aus 100 bis 125 Aminosäuren (Kwiatkowski DJ et al. 1986).

Isoformen von Gelsolin

Gelsolin kommt sowohl zytosolisch (intrazellulär) als auch sekretorisch im Blutplasma vor. Die sekretorische Isoform wird auch als plasmatisches Gelsolin oder Plasma-Gelsolin bezeichnet (Yin HL et al. 1984). Das Gewicht von Plasma-Gelsolin liegt bei 83 kDa und wiegt aufgrund von 25 zusätzlichen Aminosäuren am N-terminalen Ende etwas mehr als die zytosolische Isoform mit 80 kDa (Kwiatkowski DJ et al. 1986; Yin HL et al. 1984; Li GH et al. 2012). Sowohl die intrazelluläre als auch die extrazelluläre Isoform von Gelsolin wird durch das Chromosom 9 kodiert (Li GH et al. 2012). Die Isoformen entstehen durch das unterschiedliche Spleißen der mRNA und dem unterschiedlichen Startort der Transkription (Kwiatkowski DJ et al. 1988). Eine dritte Isoform, das zytosolische Gelsolin-3, unterscheidet sich von dem ursprünglichen zytosolischen Gelsolin durch zusätzliche elf Aminosäuren am N-terminalen Ende (Vouyiouklis DA u. Brophy PJ 1997; Silacci P et al. 2004).

Vorkommen von Gelsolin

Gelsolin liegt vor allem in Skelett-, Herz- und in der glatten Muskulatur vor, jedoch wurde es auch im Uterus, Colon und in HepG2 Zellen in der Leber gefunden. Der Hauptbildungsort ist die Skelettmuskulatur (Kwiatkowski DJ et al. 1988). Das

Gelsolin-3 wird in Oligodendrozyten exprimiert und ist hauptsächlich im Gehirn, der Lunge und in den Hoden vorhanden. Die Funktion ist noch unbekannt (Vouyiouklis DA u. Brophy PJ 1997; Silacci P et al. 2004).

Interaktion mit Aktin

Das Aktin Zytoskelett spielt eine wichtige Rolle bei vielen Zellprozessen unter anderem bei der Motilität, Formänderung und der Stabilität einer Zelle. Dies ist dadurch bedingt, dass Aktin aus seiner monomeren Form (G-Aktin) in Aktinfilamente (F-Aktin) umwandelbar ist und umgekehrt (Li GH et al. 2012).

Kalzium bindet an die G6-Domäne des Gelsolins, wodurch es zu einer Aktivierung des Gelsolinmoleküls kommt. Hierdurch wird die G2-Domäne des Gelsolins freigelegt und Aktin wird an diese gebunden (Kwiatkowski DJ et al. 1989; Burtnick LD et al. 2004; McGough AM et al. 2003). Durch die Bindung von Aktin an das Gelsolin kommt es zu einer Konformationsänderung der Gelsolindomänen. Dies führt zu einer Spaltung des gebundenen Aktins. Gleichzeitig wird die Entstehung von Aktinfilamenten verhindert, indem an das Plus-Ende des Aktins, Gelsolin-Domänen (G1, G2 und G4) binden und dadurch eine Polymerisation durch Anlagerung von G-Aktin unterbunden wird. Diesen Vorgang bezeichnet man als “Capping“ (McGough AM et al. 2003; Burtnick LD et al. 1997; McLaughlin PJ et al. 1993; Kiselar JG et al. 2003).

Aktivierung von Gelsolin

Für die Aktivität von Gelsolin sind unterschiedliche Faktoren maßgebend. Hierzu gehören die intrazelluläre Kalziumkonzentration, der intrazelluläre pH-Wert, Tyrosinphosphorylierung und die intrazelluläre Phosphatidylinositol-Bisphosphatkonzentration (PIP2) (Posey SC et al. 2000; Narayan K et al. 2003; Silacci P et al. 2004). PIP2-Isomere stellen Gegenspieler von Gelsolin dar. Diese sind in der Lage Gelsolin vom gebildeten Gelsolin-Aktin-Komplex zu dissoziieren und die Spaltung von Aktinfilamenten durch das Gelsolin zu verhindern (Yu FX et al. 1992; Liepina I et al. 2003). PIP2 ist ein wichtiges Signalmolekül. Es reguliert über Proteine die Motilität und Formänderung der Zellen, sowie den Vesikeltransport durch Endo- und Exozytose (Martin 2001).

1.2.1 Zytosolisches Gelsolin

Zytoskelett und Motilität

Das zytosolische Gelsolin nimmt Einfluss auf das Zytoskelett und die Motilität der Zellen (Cunningham CC et al. 1991; Yin 1987).

Apoptose

Es gibt mehrere Arbeiten darüber, dass Gelsolin sowohl eine Apoptose inhibieren wie auch induzieren kann.

Gelsolin ist ein wichtiges Substrat für das Enzym Caspase 3. Es wurde in einem Versuch gezeigt, dass in neutrophilen Granulozyten Gelsolin durch die Caspase 3 geteilt wird. Dadurch kommt es zu einer Interaktion mit Aktin und die Apoptose wird induziert (Leifeld L et al. 2006).

Der antiapoptotische Effekt des Gelsolins wird durch die Verbindung von Gelsolin und PIP2 erreicht. Hierbei kommt es zu einer Aufrechterhaltung des Membranpotentials der Mitochondrien und dadurch zu keiner Freisetzung von Cytochrom C. Als Folge wird Caspase 3 nicht aktiviert, somit kommt es zu keiner Apoptose (Koya et al. 2000).

1.2.2 Plasmatisches Gelsolin

Elimination von Aktin in der Blutbahn

Die plasmatische Isoform zusammen mit dem Gc-Globulin (group specific component) ist Teil des Extracellular Actin Scavenging Systems (EASS). Die Aufgabe von EASS ist die Entfernung von Aktin aus der Blutbahn (Dahl 2005). Bei ausgedehnten Zelluntergängen gelangt Aktin in die Blutbahn und kann dort polymerisieren (Lee WM u. Galbraith RM 1992). Diese Polymerisation wird durch das Gelsolin im Plasma verhindert. Zusätzlich kann das Gelsolin auch vorhandene Aktinpolymere im Blut spalten. Dadurch bindet Gc-Globulin an das gespaltene Aktin um dieses aus der Blutbahn zu entfernen (Dahl 2005). Hierdurch werden Thrombenbildung, Endothelschäden und intravaskuläre Koagulation als Folge intravaskulärer Aktinfilamente verhindert (Haddad JG et al. 1990).

Interaktion mit dem Immunsystem

Plasma-Gelsolin ist in der Lage an Lipopolysaccharide zu binden, welche sich an der äußeren Membran von gramnegativen Bakterien befindet. Ebenso kann es an Lipoteichonsäure binden, die an der Zellwand von grampositiven Bakterien zu finden ist. Es wird vermutet, dass Bakterien durch die Bindung von Gelsolin vom Immunsystem besser erkannt werden können (Bucki et al. 2008).

Zudem wird vermutet, dass Gelsolin die Freisetzung von inflammatorischen Zytokinen verhindert und dadurch eine antiinflammatorische Wirkung hat, wodurch eine Gewebeschädigung verhindert wird (Bucki R et al. 2010).

Auch bei chronisch inflammatorischen Autoimmunerkrankungen, wie der rheumatoiden Arthritis, spielt Gelsolin eine wichtige Rolle. Hierbei wurde in der Synovialflüssigkeit Aktin und Gelsolin-Aktin-Komplexe gefunden. Die Plasmagelsolinwerte zeigten sich erniedrigt, was auf einen Verbrauch von Gelsolin hindeutet (Osborn et al. 2008).

Interaktion mit Sphingosin-1-Phosphat

Eine weitere Fähigkeit von Plasmagelsolin ist es, an Sphingosin-1-Phosphat (S1P) zu binden. S1P ist ein pleiotroper Lysosphingolipid welcher bei Prozessen wie Zellproliferation, Zellmigration, Apoptose, Plättchenaggregation und Kontraktion der glatten Muskulatur involviert ist (Bucki et al. 2010; Kihara et al. 2015). Außerdem spielt S1P eine wichtige Rolle bei der Zirkulation von Lymphozyten. S1P-Rezeptoren werden von Lymphozyten benötigt, um sekundär lymphatisches Gewebe zu verlassen und in die Blutbahn zu gelangen (Brinkmann et al. 2002). Gelsolin ist in der Lage die Wirkung von S1P durch direkte Bindung zu inhibieren (Bucki R et al. 2010).

Auf diesem Wirkmechanismus beruht Fingolimod (FTY720, Gilenya, Novartis), ein S1P-Rezeptormodulator. Es ist das erste oral bioverfügbare Medikament welches bei der hochaktiven RRMS zugelassen wurde (Kihara et al. 2015). Fingolimod wirkt als funktioneller Antagonist am S1P-Rezeptor (Mullershausen et al. 2009). Hierbei kommt es zu einer peripheren Lymphopenie und dabei wahrscheinlich zu einer verminderten Einwanderung von autoreaktiven T-Lymphozyten ins ZNS. Dies führt wahrscheinlich zu einem positiven Effekt bei der MS (Kappos et al. 2006).

1.3 Klinische Aspekte von Gelsolin

In verschiedenen Arbeiten konnte gezeigt werden, dass es bei unterschiedlichen Erkrankungen zu einem Abfall der Gelsolinkonzentration im Serum kommen kann. Insbesondere bei folgenden Erkrankungen konnte dies beobachtet werden (Bucki R et al. 2008; Wang et al. 2008; Suhler et al. 1997) :

- Acute Respiratory Distress Syndrome (ARDS)
- Sepsis
- Trauma
- Prolongierte Hypoxie
- Malaria
- Leberschädigung
- Myokardinfarkt
- Septischer Schock

Es konnte bei Patienten mit einem Trauma und einer niedrigen Gelsolinkonzentration im Plasma eine schlechtere Überlebenswahrscheinlichkeit nachgewiesen werden (Mounzer et al. 1999).
Bei einigen Tumorerkrankungen zeigten sich erniedrigte Gelsolinkonzentrationen im Serum. Dementsprechend kann eine Erhöhung der Gelsolinkonzentration zu einer Tumorsuppression führen (Mullauer et al. 1993).
Insgesamt spielt Gelsolin in vielen physiologischen Abläufen und bei unterschiedlichen Krankeitsbildern eine wichtige Rolle (Li GH et al. 2012).

1.4 Gelsolin und MS

Die durchschnittliche Gelsolinkonzentration im menschlichen Plasma liegt bei 200-300 µg/ml (Smith DB et al. 1987). MS-Patienten hingegen weisen eine niedrigere Gelsolinkonzentration im Blut und im Liquor auf als Kontrollgruppen (Kulakowska A et al. 2010).
Die Gelsolinkonzentration bei Kontrollgruppen im Liquor liegt durchschnittlich bei 5,9 ± 3,8 µg/ml, wohingegen bei Patienten mit MS die Gelsolinkonzentration mit 2,1 ± 0,7 µg/ml ein deutlich niedrigeres Niveau aufweist (Kulakowska A et al. 2008). Dies lässt vermuten, dass Gelsolin im Prozess der chronischen Inflammation und der Neurodegeneration eine Rolle spielt (Kulakowska A et al.

2010). Es wurden bei MS-Patienten zwar niedrige Gelsolinkonzentrationen im Serum gefunden (Kulakowska A et al. 2010), zum heutigen Zeitpunkt ist jedoch unklar, ob ein Einfluss auf die Gelsolinkonzentration auch einen therapeutischen Effekt hat und ob Gelsolin in Zukunft als Biomarker bei der MS genutzt werden kann (Li-ChunHsieh et al. 2015). Hierbei wäre insbesondere Gelsolin im Serum von Interesse, da die Probengewinnung im Gegensatz zu Liquor viel leichter und zudem für den Patienten schonender ist.

Fingolimod, welches bei der hochaktiven RRMS-Therapie zugelassen ist, wirkt als ein Sphingosin-1-Phosphat-Analogon ähnlich wie Gelsolin (Kihara et al. 2015; Bucki et al. 2010).
Insofern könnte Gelsolin ein wichtiges Protein bei der MS sein. Weitere Erkenntnisse über dieses Protein und dessen Aussagekraft in Bezug auf bereits bestehende klinische und diagnostische Methoden könnten für die Erkrankung von großer Bedeutung sein.

Da anhand von im Liquor und im Serum vorhandener Proteine sowie deren Zusammensetzung Rückschlüsse auf diverse neurologische Krankheitsbilder gezogen werden können, ist die Proteinanalyse ein wichtiger Bestandteil der Diagnostik (Tumani et al. 2009).

Man ist daher bemüht, gezielt Biomarker zu finden, die die Krankheitsaktivität und den Krankheitsverlauf bei der Multiplen Sklerose widerspiegeln oder gar eine therapeutische Vorhersage ermöglichen (Liu et al. 2014).

1.5 Ziel und Fragestellung der vorliegenden Arbeit

Mit der vorliegenden Arbeit soll überprüft werden, ob ein Zusammenhang zwischen Gelsolin und etablierten, bei der MS angewandten klinischen und diagnostischen Methoden besteht.

Das Ziel war, eine mögliche Tendenz zu erkennen, ob Gelsolin bei der MS als Biomarker dienen kann und, wenn ja, welchen Einfluss die Krankheitsaktivität auf die Gelsolinkonzentration aufweist, sodass Gelsolin möglicherweise zu Prognosezwecken genutzt werden könnte.

Ein großer Vorteil von Gelsolin ist, dass es im Serum bestimmt werden kann. Somit könnte es als ein leicht zugänglicher Verlaufsparameter dienen.
Insgesamt werden in der vorliegenden Arbeit mehrere Faktoren untersucht, um eine mögliche Tendenz zu erkennen und aus der daraus entwickelten Hypothese den Weg für weitere Arbeiten mit größeren Fallzahlen zu ebnen.

Hieraus ergeben sich folgende Fragestellungen:

1. Besteht ein Zusammenhang zwischen dem EDSS und der Gelsolinkonzentration im Serum?
2. Besteht ein Zusammenhang zwischen der T2-Läsionslast im MRT und der Gelsolinkonzentration im Serum?
3. Gibt es einen signifikanten Unterschied der Gelsolinkonzentration bei Patienten mit und ohne immunmodulierender Therapie?
4. Zeigt sich ein Zusammenhang zwischen einem Schubereignis und der zeitlich korrelierten Gelsolinkonzentration im Serum?
5. Wie verändert sich die Gelsolinkonzentration im Serum im Krankheitsverlauf?

2. Material und Methoden

2.1 Patientengut

Für die vorliegende Untersuchung wurden die Daten von 43 Patienten gesichtet. Die Patienten befanden sich im Zeitraum von 2006 bis 2011 in der Neurologie des Rehabilitations- und Universitätsklinikums Ulm (RKU). Die Patienten kamen initial entweder als Notfall bei neu aufgetretener neurologischer Symptomatik oder wurden von niedergelassenen Ärzten überwiesen.

Es wurde eine retrospektive Analyse durchgeführt. Mittels Querschnitts-untersuchungen sollte ein möglicher Zusammenhang zwischen den erhobenen Gelsolinkonzentrationen und den erfassten Parametern dargestellt werden. Zudem wurden alle erhobenen Gelsolinwerte der 22 eingeschlossenen Patienten im zeitlichen Verlauf dargestellt, um eine mögliche Tendenz im Krankheitsverlauf zu erkennen.

Zum Zeitpunkt des Erstkontaktes, bei dem die Patienten mit einer neu aufgetretenen neurologischen Symptomatik in das RKU kamen, wurde eine klinische Untersuchung durchgeführt, gefolgt von Labordiagnostik, einer zerebralen Bildgebung mittels MRT sowie eine anschließende Lumbalpunktion. Im Verlauf stellten sich diese Patienten unterschiedlich häufig zur Verlaufsbeobachtung im RKU vor. In sechs- bis zwölfmonatigen Abständen wurden erneute Bildgebungen und Serumanalysen durchgeführt, sowie klinische Verlaufsparameter erhoben.

Für die Verwendung dieser Proben in Forschungsprojekten hat die lokale Ethikkommission der Universität Ulm mit einem Ethikvotum zugestimmt (Antrag 282/2008).

2.1.1 Ein- und Ausschlusskriterien

Die Patienten wurden anhand der vorhandenen Daten nach zuvor festgelegten Kriterien ausgewählt und in die Studie eingeschlossen.

Einschlusskriterien

Einschlusskriterien waren die Diagnose einer CIS oder RRMS. Zudem mussten die Patienten mindestens zwei zerebrale MRT (cMRT) Bildgebungen erhalten haben und die MRT-Aufnahmen mussten zur Analyse vorliegen. Des Weiteren war erforderlich, dass ausreichend Serumproben der Patienten vorhanden waren. Außerdem mussten die Patienten regelmäßig zur klinischen Verlaufsbeurteilung zu den jeweiligen Visiten erscheinen, bei welchen vom behandelnden Arzt ein aktueller EDSS erhoben wurde. Eingeschlossen wurden nur Patienten, die einen Beobachtungszeitraum von mindestens einem Jahr aufweisen konnten.

Ausschlusskriterien

Bei einigen der Patienten waren die gesichteten Daten unvollständig. Manche kamen nicht regelmäßig zu den Visiten. Bei Anderen fehlten Patientenproben, oder es waren zu geringe Mengen an Proben vorhanden. Ein Teil der Patienten hatte eine andere Diagnose als CIS oder RRMS.

Die Patienten, die einen Beobachtungsverlauf von weniger als einem Jahr hatten oder sich nur einmal zur Visite vorstellten, mussten ebenfalls von der Studie ausgeschlossen werden.

Bei denjenigen, die ausschließlich ein cMRT erhalten hatten, oder die Bildgebung nicht zur Sichtung vorlag, war ebenfalls ein Ausschluss nötig.

Insgesamt erfüllten von 43 Patienten 22 die Einschlusskriterien.

2.2 Erhobene Daten

2.2.1 Allgemeine Daten

Bei der Erstuntersuchung wurden sowohl demographische Daten wie Alter und Geschlecht, wie auch laborchemische Parameter und klinische Daten erhoben (Tabelle 1). Dies geschah anhand der vorhandenen Arztbriefe und Laborbefunde. Zur Erfassung der Daten wurde eine Datenbank erstellt.

Tabelle 1 – Erhobene laborchemische und klinische Parameter. Zwischen 2006 und 2011 wurden in der Klinik für Neurologie des Universitätsklinikums Ulm 22 Patienten mit einem CIS oder einer MS untersucht. In der Tabelle sind die Parameter aufgeführt, die dabei erhoben wurden. *(CIS = klinisch isoliertes Syndrom; MS = Multiple Sklerose; MRT = Magnetresonanztomographie)*

Laborchemische Parameter	Klinische Parameter
• Zellzahl	• Symptome
• Oligoklonale Banden	• Symptombeginn
• Gesamtprotein	• MRT-Befunde
• Albuminquotient	• Therapien

Nach Durchführung einer Laboruntersuchung und einer cMRT, wurde eine Lumbalpunktion durchgeführt. Die Proben wurden unmittelbar nach der Punktion im neurochemischen-neuroimmunologischen Labor der Universität Ulm analysiert. Die Routine-Liquordiagnostik welche die Zellzahl, oligoklonale Banden und den Albuminquotienten umfasst, erfolgte an allen 22 eingeschlossenen Patienten.
Einige der Patienten erhielten zusätzlich ein MRT der spinalen Achse.

<u>Probengewinnung</u>

Vor der Liquorpunktion erfolgte die Blutentnahme. Die Haut über der zu punktierenden Vene wurde mit farblosem Desinfektionsspray desinfiziert (Kodan® Tinktur Forte farblos, Schülke & Mayr GmbH, Norderstedt). Mit einer Butterflykanüle (Venofix®, B. Braun Melsungen AG, Melsungen) wurde die Vene des Patienten punktiert und ein Serumröhrchen (S-Monovette®, SARSTEDT AG&Co., Nürmbrecht) mit mindestens 5 ml Blut befüllt. Dieses wurde im Labor bei 4500 x g für 10 Minuten zentrifugiert (Labofuge 400R, Heraeus, Kendro

Laboratory Products GmbH, Osterode). Ein Teil des Serums wurde zur Routinediagnostik verwendet. Der Rest wurde in Eppendorfgefäße abpippetiert und sofort bei -80 °C eingefroren.

Bei den weiteren Visiten zu welchen die Patienten kamen, wurde ebenfalls mit dem oben beschriebenen Prozedere Blut gewonnen und das Serum eingefroren.

Der Liquor wurde bei Erstsymptom, häufig am Folgetag der stationären Aufnahme entnommen. Hierzu wurde der Patient zunächst über die Notwendigkeit der Lumbalpunktion und die damit verbundene Diagnostik informiert. Anschließend wurde der Patient über mögliche Risiken wie postpunktionelle Kopfschmerzen, Infektionsgefahr und Hämatombildung aufgeklärt und das Einverständnis schriftlich eingeholt. Nach Ausschluss von Kontraindikationen wie Blutgerinnungsstörungen, lokale Hautinfektionen und erhöhter intrakranieller Hirndruck, erfolgte die Lumbalpunktion (Wright BL et al. 2012). Hierzu saß der Patient mit kyphosierter Lendenwirbelsäule. Die zu punktierende Haut am Rücken wurde drei Mal mit einem farblosen Desinfektionsspray (Kodan® Tinktur Forte farblos, Schülke & Mayr GmbH, Norderstedt) desinfiziert und mit sterilen Kompressen (Mai Med GmbH & Co. KG) gereinigt. Um eine Kontamination zu vermeiden, wurden sterile Einmalhandschuhe (Peha® Soft puderfrei, Paul Hartmann AG, Heidenheim) vom punktierenden Arzt angezogen. Als Punktionsort wurde der Zwischenwirbelraum von Lendenwirbelkörper 3 und 4 oder Lendenwirbelkörper 4 und 5 gewählt. Die Führungskanüle (Introducer 1,2 x 30 mm PAJUNK GmbH Medizintechnologie, Geisingen) wurde in leicht kranialer Richtung auf Höhe der davor markierten Punktionsstelle eingestochen. Danach erfolgte die Einführung der atraumatischen Punktionskanüle (Sprotte Standard Needle 20 Gauge, PAJUNK GmbH Medizintechnologie, Geisingen) bis in den Liquorraum.

Eine atraumatische Sprotte sollte generell bevorzugt werden, um postpunktionelle Kopfschmerzen zu vermeiden (Wright BL et al. 2012). Der Mandrin wurde herausgezogen und der Liquor in eigens dafür vorgesehene Röhrchen (Polypropylenröhrchen, Firma Falcon, Kalifornien, USA) aufgefangen. Dabei erfolgte die 3-Gläser-Probe, um eine artifizielle Blutbeimengung auszuschließen (Wright BL et al. 2012). Insgesamt wurden von jedem Patienten zwischen 8 und 12 ml Liquor aufgeteilt in drei Röhrchen gewonnen. Der abgenommene Liquor wurde direkt nach der Abnahme ins Labor gebracht. Hier wurde der Liquor für die routinemäßigen diagnostischen Zwecke verwendet und Rückstellproben von je 1000 µl in Eppendorfgefäßen bei -80 °C gelagert.

2.2.2 Daten im zeitlichen Verlauf

Einige Patienten hatten bereits zum Einschlusszeitpunkt die Diagnose MS.
Bei Anderen wurde sie im Verlauf der Visiten anhand der McDonald-Kriterien (2010) gestellt.

Insgesamt stellten sich die 22 Patienten unterschiedlich häufig zu Verlaufsuntersuchungen im RKU vor. Die geringste Anzahl an Visiten waren zwei. Manche Patienten erhielten in mehreren Jahren bis zu zehn Visiten. Bei den Visiten wurden die in Tabelle 1 dargestellten Daten erfasst. Im Durchschnitt hatten die Patienten sechs Visiten. Dabei wurde bei jeder Visite Serum abgenommen und Rückstellproben archiviert. Zudem wurden die Patienten vom jeweils behandelnden Facharzt der Neurologie anamnestisch und klinisch beurteilt. Dabei wurden Schübe, EDSS und Therapien erfasst.
Außerdem erfolgte in regelmäßigen Abständen ein cMRT welches entweder im ambulanten Rahmen oder im RKU durchgeführt wurde. Für die vorliegende Arbeit wurde die Bildgebung aller 104 cMRT-Aufnahmen als Datenträger zur Analyse angefordert und gesichtet.

Alle erhobenen Daten wurden in einer Datenbank erfasst.

2.3 MRT-Befunde

2.3.1 Durchführung der MRT-Bildgebung

Die MRT-Aufnahmen wurden bei 18 Patienten bei erstmaligem Kontakt im RKU mit einem 1,5 Tesla Magnetresonanztomograph der Firma Siemens durchgeführt.
Bei vier Patienten erfolgte die erste MRT-Aufnahme ambulant in einer radiologischen Praxis.
Anschließend erfolgten in sechs- bis zwölfmonatigen Intervallen erneute cMRT-Bildgebungen. Diese Aufnahmen wurden entweder im RKU oder ambulant in radiologischen Praxen durchgeführt.
Die schriftlichen Befunde der Radiologen und die Aufnahmen als Datenträger lagen bei den jeweiligen Visiten vor.

Bei den meisten ambulant durchgeführten MRT-Aufnahmen kam ein 1,5-Tesla Kernspintomograph zum Einsatz, bei wenigen ein 3,0-Tesla Gerät.
Insgesamt wurden 24 MRT-Aufnahmen im RKU durchgeführt und 80 MRT-Aufnahmen im ambulanten Sektor.

2.3.2 Auswertung der cMRT-Bildgebungen

Jede der in dieser Arbeit erfassten 104 MRT-Aufnahmen wurde von mir und zwei weiteren Fachkräften anhand fester Kriterien gesichtet und bewertet. Ergänzend wurde der schriftliche Befund eines radiologischen Facharztes berücksichtigt.

Hierbei wurde jede T2-gewichtete Läsion gezählt. Zudem wurde die Lokalisation der Läsionen (periventrikulär, juxtakortikal, infratentoriell oder spinal) erfasst. Zusätzlich wurden die Bilder bezüglich kontrastmittelaufnehmender Läsionen ausgewertet.

<u>McDonald-Kriterien (2010):</u>
Die Diagnose einer MS wurde anhand der aktuellen Kriterien nach McDonald et al. 2010 gestellt. Dies erfolgte anhand der gewonnenen Daten.

Die neuen McDonald Kriterien beinhalten den Faktor der räumlichen und zeitlichen Dissemination, welche durch die MRT-Aufnahmen eruierbar sind.

- Man spricht von einer räumlichen Dissemination wenn jeweils eine T2-Läsion in mindestens zwei der folgenden Areale zu sehen ist: periventrikulär, juxtakortikal, infratentoriell und spinal (Polman CH et al. 2011b).
- Eine zeitliche Dissemination ist zum einen gegeben, wenn eine neue T2-Läsion und/oder mindestens eine neue Gadolinum aufnehmende Läsion im Vergleich zu früheren MRT-Aufnahmen zu sehen ist und zum anderen wenn eine asymptomatische Gadolinum aufnehmende Läsion und eine nicht Kontrastmittel aufnehmende Läsionen zeitgleich vorhanden sind (Polman CH et al. 2011b).

Zusätzlich zur zeitlichen und räumlichen Dissemination muss ein Schub mit einer klinisch objektivierbaren Läsion vorhanden sein, um die McDonald Kriterien zu erfüllen (Montalban X et al. 2010). Hierzu wurde der Krankheitsverlauf aus den Arztbriefen und Krankenakten entnommen.

Gelsolin über T2-Läsionen

Bei 86 MRT-Aufnahmen waren zeitgleich abgenommene Rückstellproben vom Serum der jeweiligen Patienten vorhanden. Für diese Untersuchungsergebnisse wurde ein Streudiagramm zwischen der Gelsolinkonzentration im Serum und den T2-Läsionen erstellt, um eine mögliche Korrelation zu erkennen.

2.4 EDSS

Der EDSS wurde bei allen Patienten bei den jeweiligen Visiten vom behandelnden Arzt erhoben. Der EDSS ist eine Leistungsskala, welche zum Zeitpunkt der Erhebung den aktuellen Grad der Behinderung bei Patienten mit MS wiedergibt. EDSS ist die am häufigsten benutzte Scala bei der MS (Barkhof 1999). Dabei werden acht funktionelle Systeme untersucht.

Diese sind (Kurtzke 1983):

- die Pyramidenbahn
- das Kleinhirn
- der Hirnstamm
- das sensorische System
- die Blasen-und Mastdarmfunktion
- die visuelle Funktion
- die zerebrale Funktion
- Andere

Die Scala ist 20-stufig und beginnt bei 0, welches für einen Normalbefund spricht und endet bei 10, was für Tod durch MS steht (Cheng EM et al. 2001).

2.5 Messung der Gelsolinkonzentration

2.5.1 ELISA

Im Rahmen dieser Arbeit wurde anhand eines Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) die Gelsolin Konzentration von 135 Serumproben und 21 Liquorproben bestimmt. Der hierbei eingesetzte ELISA wurde in der Forschungseinrichtung des Universitätsklinikums Ulm in der Klinik für Neurologie entwickelt. Hierzu wurde die Sandwich-ELISA Technik verwendet. Es werden zwei Antikörper eingesetzt, die beide an das zu untersuchende Antigen binden. In der vorliegenden Arbeit ist dies das Gelsolin. Der erste Antikörper (Capture-Antikörper), welcher ein polyklonaler Kaninchenantikörper ist, wird an den Boden der Mikrotiterplatte gebunden und die Probe mit dem zu bestimmenden Gelsolin wird dazugegeben. Dabei bindet der Antikörper auf der Platte ein Epitop des Gelsolins. Ein weiteres Epitop wird anschließend von dem danach aufgebrachten Detektions-Antikörper gebunden. Dieser Detektions-Antikörper wird wiederum von einem weiteren IgG-Antikörper gebunden, welcher an das Enzym Horseradish Peroxidase (HRP) gekoppelt ist. Das danach zugegebene Tetrametyhlbenzidin (TMB) wird je nach Menge der Antikörper und damit entsprechend der vorhandenen Gelsolinmoleküle oxidiert. Die Intensität der daraus entstehenden Blaufärbung steht somit in direktem Zusammenhang mit der Gelsolinkonzentration. Die Oxidierung wird durch hinzufügen von Schwefelsäure angehalten. Dadurch kommt es zu einem Farbumschlag von Blau zu Gelb (Abb. 1). Anschließend erfolgt die photometrische Bestimmung der Extinktion bei 450 nm. Hierdurch kann indirekt die Gelsolinkonzentration bestimmt werden.

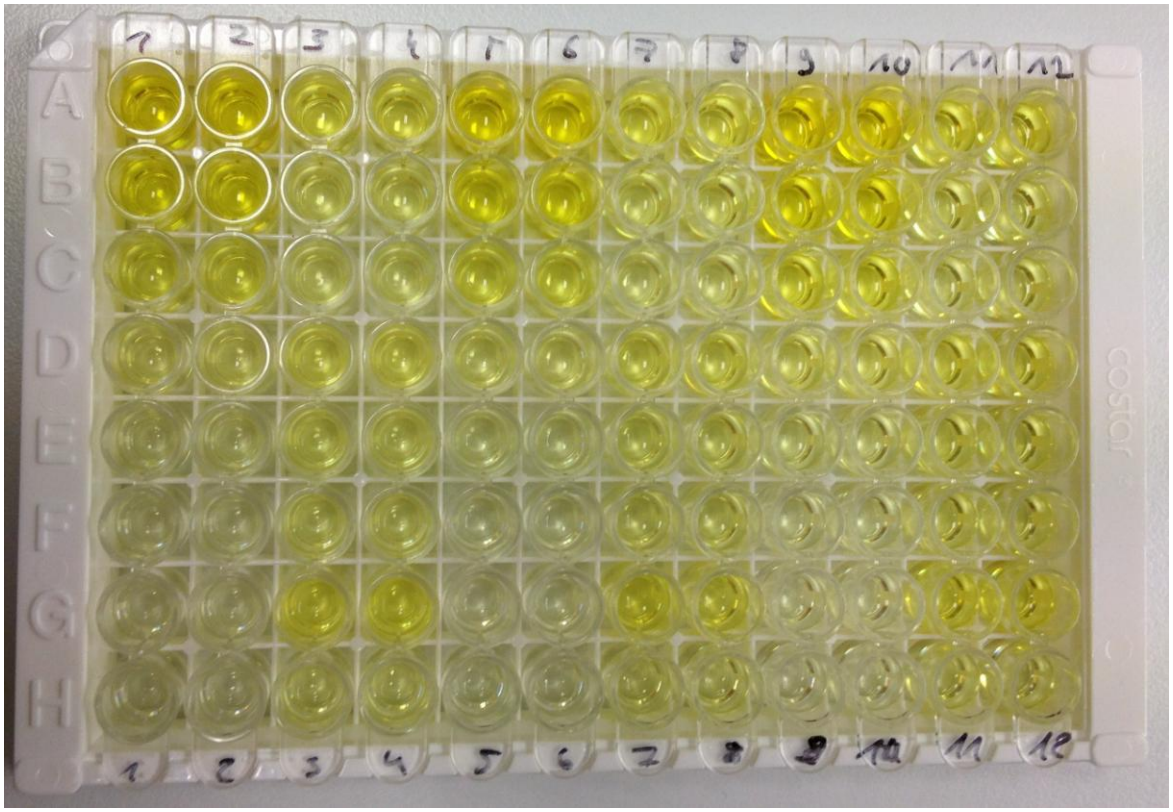


Abbildung 1 – ELISA-Mikrotiterplatte zur Bestimmung der Gelsolinkonzentration mit 96 Wells. Zwischen 2006 und 2011 wurden in der Klinik für Neurologie des Universitätsklinikums Ulm 22 Patienten mit einem CIS oder einer MS untersucht. Für die vorliegende Arbeit wurden die Gelsolinkonzentrationen von Serum und Liquorproben bestimmt. In Reihe 1 und 2 befinden sich die Proben für die Standardreihe. In den Reihen 3 bis 12 die jeweiligen Patientenproben. Jede Probe wurde doppelt bestimmt, so befindet sich zum Beispiel in Well 5A und 6A dieselben Probenlösungen eines Patienten, wie auch in 7D und 8D eines anderen Patienten. Je intensiver die Gelbfärbung der einzelnen Wells, desto höher ist die Gelsolinkonzentration in der jeweiligen Probe. *(CIS = klinisch isoliertes Syndrom; MS = Multiple Sklerose; ELISA = Enzyme-linked Immunosorbent Assay)* (Universitätsklinikum Ulm 2006-2011)

2.5.2 Materialien

Chemikalien:

- BSA (Bovine Serum Albumin) (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland)
- Gelsolin (C-20) sc6405 goat polyklonale IgG (“detection“-Antikörper) (Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, USA)
- PBS (Phosphate Buffered Saline) (10x), 1 L, Katalog Nr. 161-0780 (Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, USA)
- Plasma Gelsolin (Human recombined) Katalog Nr. HP 66, 4 x 20 µg (Cytoskeleton, Inc., Denver, USA)

- Polyklonaler Rabbit Anti Human Gelsolin (“Capture-Antikörper“) Code 0146 (Dako Denmark A/S, Glostrup, Dänemark)
- Rabbit polyclonal Secondary Antibody to Goat IgG-H&L (HRP) AB 6741 (Zweit-Antikörper für Detektions-Antikörper) (Abcam plc, Cambridge, UK)
- Schwefelsäure 2 N (H2SO4) (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland)
- TMB Substrat Kit (3,3’5,5’-Tetramethylbenzidin Lösung 0,4g/L; 200 ml + Peroxid Lösung (0,02 % Hydrogenperoxid in Zitronensäurebuffer, 200 ml)) (Thermo Fischer Scientific, Waltham, USA)
- Tween 20 (Polyoxyethylen Sorbitan Monolaureate) (ICI Americas Inc., Bridgewater, USA)
- Wasser, bidestilliert (Aqua B. Braun; Ecotainer®, Melsungen AG, Melsungen, Deutschland)

Gebrauchsmaterialien:

- 96-Well Platte (Sarstedt AG, Nürmbrecht, Deutschland)
- Microtubes (BRAND GmbH & Co. KG, Wertheim, Deutschland)
- Pipetten und Pipettenspitzen (Eppendorf® Reference, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland)
- Spritzflasche (VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland)

Geräte:

- Brutschrank (Heraeus Instruments)
- Photometer (Spectra Rainbow, Tecan® Trading AG, Zürich, Schweiz)
- Mischer (Vortex MS2 Minishaker IKA®)

EDV Programme:

- PC-Software zur Extinktionsmessung (Easy Fit, SLT Labinstruments Deutschland GmbH, Crailsheim, Deutschland)
- Statistik-Software (Microsoft Office Excel 2011)

2.5.3 Testablauf

Vorbereitung:

Die Patientenproben wurden unmittelbar vor dem Testablauf langsam auf Trockeneis aufgetaut. Liquor und Serumproben eines Patienten wurden alle im selben analytischen Lauf gemessen. Es wurden stets Doppelmessungen jeder Probe durchgeführt, um anschließend den Mittelwert zu berechnen und dadurch die Präzision zu erhöhen und mögliche Abweichungen zu reduzieren.
Die Belegung der 96 Wells (Vertiefungen) der jeweiligen Mikrotiterplatte wurde vor der Messung auf einem Platten-Layout geplant.

Durchführung:

1. **Plattenbeschichtung**

   Der Capture-Antikörper, welcher bei -20 °C gelagert ist, wird mit einem Verhältnis von 1:500 mit PBS verdünnt. Dies bedeutet, dass pro Mikrotiterplatte 20 µl Capture-Antikörper mit 9,98 ml PBS (1x) gemischt wurden.
   Anschließend wird jedes Well der Mikrotiterplatte mit jeweils 100 µl Capture-Antikörper-Lösung benetzt. Nachdem die Platte mit einem “Plate sealer“ bedeckt wird, kommt die Platte über Nacht in einen Inkubator bei 4 °C.

2. **Platte blocken**

   Am Folgetag wird die Capture-Antikörper-Lösung aus der Platte ausgeschüttet. Es wird eine Waschlösung hergestellt, die aus 0,05 %igem Tween und PBS (1x) besteht.
   Für jede Platte sind dies jeweils:
   3 ml 10 %iges Tween + 60 ml PBS (10x) + 537 ml ddH_2O
   ⇨ 600 ml 0,05 %iges Tween + PBS (1x)
   Mit dieser Waschlösung wird die Platte gewaschen. Hierzu wird die Waschlösung in eine Spritzflasche gegeben und jedes Well wird mit dieser Lösung befüllt. Anschließend wird die Mikrotiterplatte ausgeschüttet und der Rest mittels Ausklopfen auf Papiertücher entfernt. Dieser Vorgang wird insgesamt drei Mal wiederholt.

Danach werden 250 µl Block-Lösung in jedes Well pipettiert. Diese besteht aus BSA (1 %) und PBS (1x).

Hierzu wird eine 10 %ige BSA Lösung aus BSA mit PBS hergestellt. Anschließend werden 3 ml aus dieser Lösung mit 27 ml ddH_2O gemischt.

3 ml BSA (10 %) + PBS (10x) + 27 ml ddH_2O

⇨ 30 ml BSA (1 %) + PBS (1x)

Nach der Versiegelung mit einem „Plate sealer“ wird die Platte bei 37 °C für 60 Minuten in einem Brutschrank inkubiert.

3. **Proben aufbringen**

Die Block-Lösung wird ausgeschüttet und die Platte drei Mal mit der Waschlösung gewaschen und erneut der Rest mittels Ausklopfen auf Papiertüchern entfernt.

Anschließend kommt in jedes Well eine Lösung aus
50 µl BSA + PBS 0,5 %.

Danach werden den Wells 50 µl der jeweiligen 1:100 verdünnten Liquorprobe oder 1:4000 verdünnten Serumprobe hinzugefügt.

Liquorproben:

Es werden 10 µl Liquor in 490 µl BSA + PBS 0,5 % gegeben (Verdünnung 1:50). Aus dieser werden 50 µl abpippetiert und mit 50 µl BSA + PBS (0,5 %) gemischt (Verdünnung 1:2). Somit befindet sich in jedem Well eine Liquorverdünnung von 1:100.

Serumproben:

Für die Serumproben werden 10 µl Serum mit 490 µl BSA + PBS 0,5 % gemischt (Verdünnung 1:50). Anschließend werden aus dieser Mischung erneut 10 µl abpippetiert und in 390 µl BSA + PBS 0,5 % gegeben (Verdünnung 1: 2000). Es wird eine Serumverdünnung von 1:4000 erreicht, indem nun aus der 1: 2000 Verdünnung 50 µl in 50 µl BSA + PBS 0,5 % gegeben wird.

Standardkurve:

Für die Standardkurve wird human recombined Plasma Gelsolin der Firma Cytoskeleton verwendet. Für die Standardreihe benötigt man 1 ml

Standardlösung. Hierzu werden 2 µl von dem rekombinanten Plasma Gelsolin mit 998 µl einer Lösung aus PBS (1x) und BSA 0,5 % gemischt. Anschließend kommen in sieben Eppendorf-Gefäße jeweils 500 µl der hergestellten Lösung aus PBS (1x) und BSA 0,5 %. Die Stocklösung mit einer Gelsolinkonzentration von 250 ng/ml ergibt die erste Standardkonzentration. Nun werden 500 µl aus dieser Stocklösung in das mit 500 µl vorgelegte Eppendorf-Gefäß gegeben und zu einer Konzentration von 125 ng/ml verdünnt. Nach gründlicher Mischung werden aus dieser Verdünnung erneut 500 µl in das nächste vorgelegte Eppendorf-Gefäß pipettiert um eine Gelsolinkonzentratin von 62,5 ng/ml zu erhalten. Dieser Vorgang wiederholt sich bis zum letzten Eppendorf-Gefäß. In ein achtes Eppendorf-Gefäß wird nur die Verdünnungslösung aus PBS (1x) und BSA (1 % oder 0,5 %) gegeben. Somit hat dieses eine Gelsolin Konzentration von 0 ng/ml.

Standardreihe:

Standard 1: 250 ng/ml
Standard 2: 125 ng/ml
Standard 3: 62,5 ng/ml
Standard 4: 31,25 ng/ml
Standard 5: 15,6 ng/ml
Standard 6: 7,8 ng/ml
Standard 7: 3,9 ng/ml
Standard 8: 0 ng/ml

Die Platte wird erneut versiegelt und bei 37 °C für weitere 2 Stunden inkubiert.

4. **Detektions-Antikörper**

Der Inhalt der Platte wird ausgeschüttet und die Platte auf Papiertücher ausgeklopft. Nun wird 100 µl Detektions-Antikörper-Lösung in jedes Well pippetiert. Diese wird hergestellt, indem 20 µl Detektions-Antikörper, welcher bei 4 °C gelagert ist, mit 9,98 ml BSA + PBS 0,5 % gemischt und dadurch eine Verdünnung von 1:500 erreicht wird.
Die Platte wird leicht an den Seiten beklopft und mit Plate sealer bedeckt und für eine weitere Stunde bei 37 °C inkubiert.

5. **HRP-Antikörper**

Nun wird die Platte erneut ausgeschüttet und mit der Waschlösung drei Mal gewaschen und auf Papiertücher ausgeklopft.
Es kommen 100 µl HRP-Antikörper-Lösung in jedes Well. Diese wird hergestellt indem 1 µl HRP-Antikörper mit 129 µl 0,05 % Tween + PBS (1x) gemischt wird und aus dieser 1:130 Verdünnung nun 100 µl abpippetiert und in 9,9 ml 0,05 % Tween + PBS (1x) gegeben werden.
Daraus entsteht eine Verdünnung von 1:13.000.
Nach der Versiegelung der Platte wird diese erneut für 30 Minuten bei 37 °C inkubiert.

7. **Substrat**

Währenddessen wird das TMB auf Zimmertemperatur gebracht. Das Substrat wird hergestellt, indem zwei Reagenzien miteinander gemischt werden. Hierzu wird das TMB (0,4 g/L) und die Peroxidlösung (0,02 %) im Verhältnis 1:1 gemischt. Der Platteninhalt wird geleert und es erfolgen vier Waschgänge mit der Waschlösung.
Nun werden in jedes Well 100 µl der Substrat-Lösung gegeben, versiegelt und für weitere 25 Minuten bei 37 °C inkubiert.
Hierbei kommt es zu einem blauen Farbumschlag, da das Substrat mit dem HRP reagiert.

8. **Stopp-Lösung**

Als letztes wird die Stopp-Lösung, bestehend aus Schwefelsäure, auf Zimmertemperatur gebracht und jeweils 50 µl in jedes Well gegeben. Durch sanftes Beklopfen der Plattenseite kommt es zur Vermischung, wobei ein Farbumschlag von Blau zu Gelb ist zu sehen. Hierbei wird die Enzymreaktion durch die Schwefelsäure angehalten.

9. **Messung**

Innerhalb von wenigen Minuten wird die Extinktion der Mikrotiterplatte bei einer Wellenlänge von 450 nm photometrisch gemessen. Vor der Messung wurde die Lokalisation der Standardreihe, welche genauso wie die Proben doppelt aufgetragen wurden, mit den zugehörigen Konzentrationen in die dafür geeignete PC-Software “Easy fit“ eingegeben. Durch die vom

Photometer bestimmten Extinktionen wurde eine Standardreihe erstellt und anhand dieser konnten die Probenkonzentrationen berechnet werden. Die Standardkurve und die Extinktionen mit den zugehörigen Gelsolin-Konzentrationen wurden vom Programm dargestellt und konnten anschließend ausgedruckt werden.

2.5.4 Validierung des Gelsolin-ELISA

Zur Validierung des verwendeten ELISA's wurden vorab Wiederfindungs- und Linearitätsexperimente durchgeführt.

Wiederfindungsexperiment

Um die Wiederfindungsrate zu errechnen, wurden folgende Lösungen benötigt:

1. Sample-Neat-Lösung: 1:4000 Serumprobe und 1:100 Liquorprobe
2. Stock-Lösung: enthielt den Standard mit einer Gelsolinkonzentration von 250 ng/ml. Dies entspricht dem Standard mit der höchsten Gelsolinkonzentration.
3. Sample-Spike-Lösung: Die Patientenprobe wurde mit der Stock-Lösung vermischt. Die Patientenprobe wurde mithilfe einer 1:4 (62,5 ng/ml) verdünnten und einer 1:16 (15,6 ng/ml) verdünnten Stock-Lösung zu einer 1:4000 Sample-Spike-Lösung gemischt.
4. Kontroll-Spike-Lösung: Die Stock-Lösung wurde im Verhältnis 1:4 und 1:16 mit dem Proben-Verdünnungspuffer vermischt um Spikes mit 62,5 ng/ml und mit 15,6 ng/ml zu erhalten.

Jede Gelsolinkonzentration wurde wie in Kapitel 2.5.3 beschrieben, zweimal photometrisch gemessen. Es konnte anschließend anhand der gemessenen Werte und der folgenden Formel die Wiederfindungsrate berechnet werden:

$$Wiederfindung\ des\ Sample\ Spike\ in\ \% = \frac{Sample\ Spike - Sample\ Neat}{Kontroll\ Spike} \times 100$$

Linearitätsexperimente

Um die Linearität einer Verdünnungsreihe zu errechnen, war die Herstellung von folgenden Verdünnungsreihen notwendig:

Verdünnungsreihe der Sample-Neat-Lösung (Serum):

1:2-Verdünnung: 50 µl der Sample-Neat-Lösung + 50 µl der Pufferlösung

1:4-Verdünnung: 50 µl der 1:2 Verdünnung + 50 µl der Pufferlösung

Verdünnungsreihe der Sample-Neat-Lösung (Liquor):

1:2-Verdünnung: 50 µl der Sample-Neat-Lösung + 50 µl der Pufferlösung

Jede Gelsolinkonzentration wurde wie in Kapitel 2.5.3 beschrieben, ebenso zweimal photometrisch gemessen. Die verdünnte Sample-Neat-Lösung als Ausgangswert wurde vierfach gemessen. Anschließend konnte anhand der gemessenen Werte und der folgenden Formel die Wiederfindung der Verdünnungsreihe berechnet werden:

$$Wiederfindung\ der\ Verdünnung\ in\ \% = \frac{Verdünntes\ Sample\ Neat}{Sample\ Neat\ x\frac{1}{2}bzw.\frac{1}{4}} \times 100$$

2.5.5 Auswertung der Ergebnisse

Nach jeder Messung erfolgte ein Abgleich der gemessenen Konzentrationen mit der Standardreihe und den Kontrollen.

Die ermittelten Messwerte wurden anschließend mit den jeweiligen Verdünnungsfaktoren der Proben multipliziert um die tatsächliche Konzentration von Gelsolin in µg/ml zu erhalten. Dies wurde sowohl für die Liquorproben wie auch für die Serumproben angewandt.

2.6 Statistische Analyse

Die Daten wurden mithilfe der Software “Microsoft Office Excel 2011“ erfasst und ausgewertet.

Die Streudiagramme und Boxplots wurden ebenfalls mit dieser PC-Software erstellt.

Deskriptive Statistik:

Der Mittelwert, die Standardabweichung, der Median, das Minimum und Maximum wurden berechnet. Die Ergebnisse wurden in Tabellen, Boxplots und Streudiagrammen dargestellt.

Korrelationsanalyse:

Um die Stärke des Zusammenhangs zu quantifizieren wurde der Korrelationskoeffizient nach Pearson für die jeweiligen Werte anhand des Bestimmtheitsmaßes R^2 berechnet. Für alle Korrelationskoeffizienten wurde ein zweiseitiger Signifikanztest für eine Pearson-Korrelation durchgeführt.

T-Test:

T-Tests wurden herangezogen, um signifikante Unterschiede zwischen einzelnen Gruppen festzustellen. Hierbei wurde der zweiseitige T-Test für verbundene Stichproben angewandt.

Signifikanzniveau:

Das Signifikanzniveau wurde für alle Tests auf p-Werte unter 0,05 festgelegt.

3. Ergebnisse

3.1 Validierung des Gelsolin-ELISA

3.1.1 Wiederfindung

Das Wiederfindungsexperiment für Gelsolin im Serum und im Liquor wurde, wie in Kapitel 2.5.4 beschrieben, durchgeführt und mittels der dort aufgeführten Formel die Wiederfindungsrate berechnet. Diese betrug für Liquor im Mittel 123,6 % mit einer Spannweite von 117,3 % bis 129,9 %. Für Serumgelsolin war die Wiederfindungsrate im Mittel 94,6 % mit einer Spannweite von 92,7 % bis 96,5 %. Die Wiederfindungsrate von Gelsolin im Serum und im Liquor gemeinsam betrug 109,1 %.

Tabelle 2 – Wiederfindung des Gelsolin-ELISA im Serum: Zwischen 2006 und 2011 wurden in der Klinik für Neurologie des Universitätsklinikums Ulm 22 Patienten mit einem CIS oder einer MS untersucht. Für die vorliegende Arbeit wurden die Gelsolinkonzentrationen von Serumproben bestimmt. Vorab wurden Wiederfindungsexperimente durchgeführt. Dies erfolgte mit zwei unterschiedlichen Spike-Konzentrationen (1. Spalte). Es wurde eine Patientenprobe nativ (4. Spalte), die Patientenprobe mit hinzugefügtem Spike (2. Spalte) und der Spike (3. Spalte) separat gemessen. Mit den Ergebnissen der Messungen der drei Proben konnte die Wiederfindung berechnet werden (5. Spalte). (*Spike: Probe mit definierter Gelsolinkonzentration; ELISA = Enzyme-linked Immunosorbent Assay; CIS = klinisch isoliertes Syndrom; MS = Multiple Sklerose)*

Versuch	**Serum mit Spike [ng/µl]**	**Kontroll Spike [ng/µl]**	**Nativ Serum [ng/µl]**	**Wiederfindung [%]**
Spike mit 62,5 ng/µl	96,047	49,049	50,596	92,7
Spike mit 15,6 ng/µl	60,877	10,659	50,596	96,5

Tabelle 3 – Wiederfindung des Gelsolin-ELISA im Liquor: Zwischen 2006 und 2011 wurden in der Klinik für Neurologie des Universitätsklinikums Ulm 22 Patienten mit einem CIS oder einer MS untersucht. Für die vorliegende Arbeit wurden die Gelsolinkonzentrationen von Liquorproben bestimmt. Vorab wurden Wiederfindungsexperimente durchgeführt. Dies erfolgte mit zwei unterschiedlichen Spike-Konzentrationen (1. Spalte). Es wurde eine Patientenprobe nativ (4. Spalte), die Patientenprobe mit hinzugefügtem Spike (2. Spalte) und der Spike (3. Spalte) separat gemessen. Mit den Ergebnissen der Messungen der drei Proben konnte die Wiederfindung berechnet werden (5. Spalte). (*Spike = Probe mit definierter Gelsolinkonzentration; ELISA = Enzyme-linked Immunosorbent Assay; CIS = klinisch isoliertes Syndrom; MS = Multiple Sklerose)*

Versuch	**Liquor mit Spike [ng/µl]**	**Kontroll Spike [ng/µl]**	**Nativ Liquor [ng/µl]**	**Wiederfindung [%]**
Spike mit 62,5 ng/µl	97,138	49,049	39,583	117,3
Spike mit 15,6 ng/µl	53,430	10,659	39,583	129,9

3.1.2 Linearität

Das Linearitätsexperiment wurde, wie in Kapitel 2.5.4 beschrieben, durchgeführt. Die Wiederfindungsrate von Gelsolin im Liquor und im Serum bei unterschiedlichen Verdünnungen betrug im Mittel 98,6 %.

Die Wiederfindungsrate der unterschiedlich verdünnten Gelsolinkonzentrationen im Serum betrug im Mittel 101,63 % und im Liquor 92,5 %.

Tabelle 4 – Ausgangswerte der Verdünnungsreihen: Zwischen 2006 und 2011 wurden in der Klinik für Neurologie des Universitätsklinikums Ulm 22 Patienten mit einem CIS oder einer MS untersucht. Für die vorliegende Arbeit wurden die Gelsolinkonzentrationen von Liquor- und Serumproben bestimmt. Vor den Messungen wurde die Wiederfindungsrate im Linearitätsexperiment berechnet. Hierzu wurden jeweils zwei Serum- und Liquorproben viermal gemessen. Die in der Tabelle dargestellten Durchschnittswerte dieser vier Messungen pro Probe wurden als Ausgangwerte für das Linearitätsexperiment verwendet. *(A = Probe von Patient 1; B = Probe von Patient 2; CIS = klinisch isoliertes Syndrom; MS = Multiple Sklerose)*

Ausgangswert [ng/µl]:			
Serum A	Serum B	Liquor A	Liquor B
63,823	80,295	24,142	41,987

Tabelle 5 – Linearität des Gelsolin-ELISA: Zwischen 2006 und 2011 wurden in der Klinik für Neurologie des Universitätsklinikums Ulm 22 Patienten mit einem CIS oder einer MS untersucht. Für die vorliegende Arbeit wurden die Gelsolinkonzentrationen von Liquor- und Serumproben bestimmt. Vor den Messungen wurde die Wiederfindungsrate im Linearitätsexperiment berechnet. Die Linearitätsexperimente wurden mit Serum- und Liquorproben von zwei Patienten durchgeführt. Die Serumproben wurden in zwei unterschiedlichen Verdünnungen gemessen (1:2 und 1:4), Liquor in einer Verdünnung (1:2). In Spalte 3 sind die durch Berechnung erwarteten Werte zu sehen. Hierzu wurden vorab jeweils zwei Serum- und Liquorproben viermal gemessen. Die Durchschnittswerte dieser vier Messungen pro Probe wurden als Ausgangwerte für die Berechnung der erwarteten Werte verwendet. Spalte 4 gibt die tatsächlich gemessenen Werte wieder. Mittels dieser Werte konnte die Wiederfindungsrate berechnet werden. *(A = Probe von Patient 1; B = Probe von Patient 2; ELISA = Enzyme-linked Immunosorbent Assay, CIS = klinisch isoliertes Syndrom; MS = Multiple Sklerose)*

Versuch	Verdünnung	Erwarteter Wert [ng/µl]	Gemessener Wert [ng/µl]	Wiederfindung [%]
Serum A	1:2 Serum	31,912	32,906	103,1
	1:4 Serum	15,956	15,981	100,2
Serum B	1:2 Serum	40,148	41,236	102,7
	1:4 Serum	20,074	20,170	100,5
Liquor A	1:2 Liquor	12,071	11,107	92,0
Liquor B	1:2 Liquor	20,993	19,525	93,0

3.2 Relevante Patientendaten

Es wurden 22 Patienten zwischen 2006 und 2011 in der Klinik für Neurologie des Universitätsklinikums Ulm untersucht. Das häufigste Erstsymptom mit dem sich die Patienten vorstellten war eine Retrobulbärneuritis gefolgt von Sensibilitätsstörungen. Das Alter der Patienten wurde zum Zeitpunkt der Erstpunktion erfasst. Sie waren zwischen 17 und 56 Jahre alt. Bei 50% der Patienten wurde bei der ersten Vorstellung ein CIS diagnostiziert. Die anderen 50% der Patienten erfüllten bei Erstvorstellung bereits die Diagnosekriterien einer RRMS.

In der folgenden Tabelle sind die demographischen Daten der untersuchten Patienten zu sehen.

Tabelle 6 – Alter, Geschlecht, Diagnosen und Symptome der untersuchten Patienten:
Zwischen 2006 und 2011 wurden in der Klinik für Neurologie des Universitätsklinikums Ulm 22 Patienten mit einem CIS oder einer MS untersucht. Die Patienten befanden sich unterschiedlich lange für die vorliegende Arbeit in Beobachtung (siehe Zeile 6). Von den 22 untersuchten Patienten konvertierten 8 vom einem initialen CIS im Verlauf zu einer MS. In der Zeile „Zeit bis zur Konversion" ist die Dauer bis zu dieser Konversion dargestellt. In der letzten Zeile sind die Symptome von allen Patienten die während des Beobachtungszeitraums erfasst worden sind aufgeführt, in der vorletzten Zeile die Symptome der Patienten bei Einschluss in die Untersuchung. *(n = Anzahl; MS = Multiple Sklerose, CIS = klinisch isoliertes Syndrom)*

	Untersuchte Patienten	**n = 22**	
Alter, *Jahre*	Mittelwert:	31,9	
	Median:	26	
Geschlecht, *n (%)*	Weiblich:	8	(36,4)
	Männlich:	14	(63,6)
Diagnose zu Beobachtungsbeginn,	MS	11	(50)
n (%)	CIS	11	(50)
Diagnose zum Beobachtungsende,	MS	19	(86)
n (%)	CIS	3	(14)
Zeit bis zur Konversion, *Monate*	Mittelwert:	24	
	Minimum:	2	
	Maximum:	63	
Beobachtungszeitraum, *Monate*	Mittelwert:	38	
	Minimum:	14	
	Maximum:	63	
Erstsymptome, *n*	Retrobulbärneuritis	10	
	Sensibilitätsstörung	10	
	Parese	2	
Symptome im Verlauf, *n*	Keine Symptome	5	
	Retrobulbärneuritis	1	
	Sensibilitätsstörung	14	
	Parese	2	

3.3 Routinediagnostik des Liquors

Die Lumbalpunktion erfolgte in der Aufnahmesituation, spätestens jedoch am Folgetag. Die Standardanalyse des Liquors wurde bei allen 22 Patienten im Liquorlabor des Rehabilitations- und Universitätsklinikums Ulm durchgeführt. Hierbei wurden die Zellzahl, die OKBs und der Albuminquotient bestimmt. Die OKBs waren bei 100 % der Patienten positiv. Die intrathekale Immunglobulin-Synthese wurde bei 20 Patienten bestimmt und zeigte sich bei 65 % dieser Patienten positiv.

Tabelle 7 – Liquor Standarddiagnostik:

Zwischen 2006 und 2011 wurden in der Klinik für Neurologie des Universitätsklinikums Ulm 22 Patienten mit einem CIS oder einer MS untersucht. Bei diesen Patienten wurde Liquor gewonnen und eine Standardanalyse durchgeführt. Es wurde nicht bei allen Patienten der Albuminquotient und die Immunglobulin-Synthese bestimmt. *(CSF = cerebrospinale Flüssigkeit; n = Anzahl; OKB = Oligoklonale Banden; L+: Oligoklonale Banden im Liquor; S+: Oligoklonale Banden im Serum; S-: Keine oligoklonalen Banden im Serum; Q_{alb}= Albuminquotient von Liquor und Serum; IgG= Immunglobulin G; IgA= Immunglobulin A; IgM= Immunglobulin M)*

CSF	**Untersuchte Patienten:**	**[n = 22]**
Zellzahl, *pro µl*	Mittelwert:	7,32
	Median:	7
OKB, *n*	L+/S-	2
	L++/S+	20

CSF	**Untersuchte Patienten:**	**[n = 21]**
Q_{alb} (x10^{-3})	Mittelwert:	4,84
	Median:	4,9

CSF	**Untersuchte Patienten:**	**[n = 20]**	
IgG-Synthese	*n, (%)*	9	(45)
IgA-Synthese	*n, (%)*	0	(0)
IgM-Synthese	*n, (%)*	4	(20)

Tabelle 8 – Liquor Standarddiagnostik:

Zwischen 2006 und 2011 wurden in der Klinik für Neurologie des Universitätsklinikums Ulm 22 Patienten mit einem CIS oder einer MS untersucht. Bei diesen Patienten wurde Liquor gewonnen und eine Standardanalyse durchgeführt. Es wurde nicht bei allen Patienten eine Zelldifferenzierung in der CSF durchgeführt. *(CSF = cerebrospinale Flüssigkeit; n = Anzahl)*

CSF	**Untersuchte Patienten:**	**[n = 15]**	
Lympho-/Monozyten	*n, (%)*	4	(26,7)
Aktivierte Lympho-/Monozyten	*n, (%)*	1	(6,7)
Aktivierte Lympho-/Monozyten und Plasmazellen	*n, (%)*	10	(66,7)

3.4 Vergleich der Gelsolinkonzentration bei CIS- und MS-Patienten

Bei 21 Patienten erfolgte die Doppelbestimmung der Gelsolinkonzentration im Liquor, welches zum Zeitpunkt der diagnostischen Erstpunktion gewonnen wurde. Es wurde anschließend der Mittelwert der Einzelmessungen für die weitere Analyse verwendet. Hierbei wurde zwischen MS- und CIS-Patienten unterschieden. Es konnte die Gelsolinkonzentration im Liquor bei 11 MS- und 10 CIS-Patienten gemessen werden.

Ebenso erfolgte die Bestimmung der Gelsolinkonzentration im Serum bei 21 Patienten zum Zeitpunkt der Erstuntersuchung. Zu diesem Zeitpunkt hatten 10 Patienten die Diagnose CIS und 11 Patienten eine MS.

In den folgenden Abbildungen und Tabellen wird ein möglicher signifikanter Unterschied zwischen den Gelsolinkonzentrationen sowohl im Liquor als auch im Serum bei CIS-und MS-Patienten dargestellt.

Tabelle 9 – Gelsolin im Liquor zum Zeitpunkt der Erstpunktion: Zwischen 2006 und 2011 wurden in der Klinik für Neurologie des Universitätsklinikums Ulm 22 Patienten mit einem CIS oder einer MS untersucht. Bei diesen Patienten wurde zum Einschluss in die Untersuchung Liquor gewonnen. Bei 21 der 22 untersuchten Patienten waren ausreichende Rückstellproben des Liquors vorhanden. So konnte in diesen Proben die Gelsolinkonzentration doppelt bestimmt und der Mittelwert für die weitere Auswertung verwendet werden. Die Gelsolinkonzentrationen der 11 Patienten mit einer MS und die Konzentrationen der 10 Patienten mit einem CIS wurden separat ausgewertet. *(CSF = cerebrospinale Flüssigkeit; n = Anzahl; MS = Multiple Sklerose; CIS = klinisch isoliertes Syndrom; SD = Standardabweichung*)

CSF Analyse		**[n = 21]**
Gelsolin Liquor; *µg/ml (SD)*	Mittelwert:	4,03 (± 1,04)
Proben der Patienten mit MS und CIS	Median:	4,01
	Minimum:	2,16
	Maximum:	5,81
		[n = 11]
Gelsolin Liquor; *µg/ml (SD)*	Mittelwert:	3,61 (± 1,12)
Proben der Patienten mit MS	Median:	3,15
		[n = 10]
Gelsolin Liquor; *µg/ml (SD)*	Mittelwert:	4,50 (± 0,75)
Proben der Patienten mit CIS	Median:	4,60

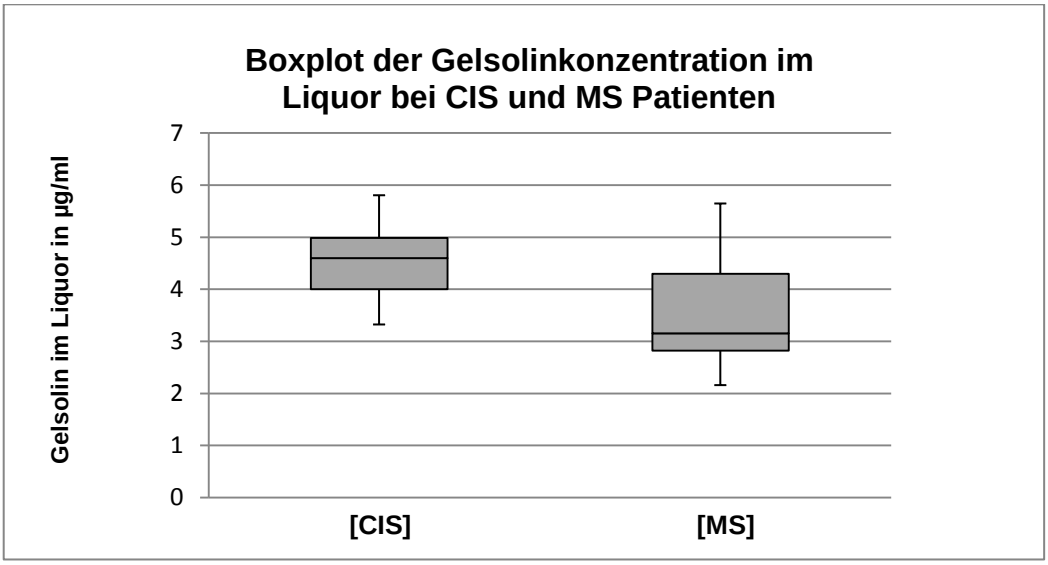


Abbildung 2 – Boxplot der Gelsolinkonzentration im Liquor. Zwischen 2006 und 2011 wurden in der Klinik für Neurologie des Universitätsklinikums Ulm 22 Patienten untersucht. Bei diesen Patienten wurden zum Einschluss in die Untersuchung Liquorproben gewonnen. Aus diesen Proben konnte die Gelsolinkonzentration von 10 Patienten mit einem CIS und 11 Patienten mit einer MS bestimmt werden. Von einem Patienten waren keine Rückstellproben vorhanden. Die Ergebnisse sind in den Boxplots dargestellt. Die Mittellinie der Box stellt den Median dar, die obere Linie das Maximum und die untere Linie das Minimum. Y-Achse: Gelsolinkonzentration im Liquor in µg/ml. (*CIS = klinisch isoliertes Syndrom; MS = Multiple Sklerose)*

Beurteilung: Im T-Test zeigte sich der p-Wert 0,047. Somit besteht ein signifikanter Unterschied der Gelsolinkonzentration im Liquor zwischen MS-Patienten und CIS-Patienten.

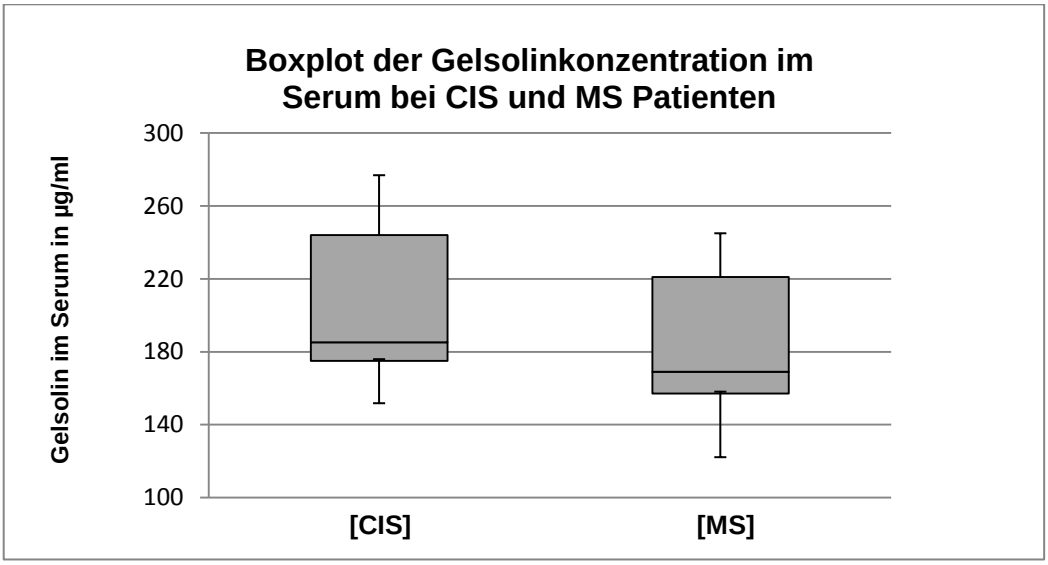


Abbildung 3 – Boxplot der Gelsolinkonzentration im Serum. Zwischen 2006 und 2011 wurden in der Klinik für Neurologie des Universitätsklinikums Ulm 22 Patienten untersucht. Bei diesen Patienten wurden zum Einschluss in die Untersuchung Serumproben gewonnen. Aus diesen Proben konnte die Gelsolinkonzentration von 10 Patienten mit einem CIS und 11 Patienten mit einer MS bestimmt werden. Von einem Patienten waren keine Rückstellproben vorhanden. Die Ergebnisse sind in den Boxplots dargestellt. Die Mittellinie der Box stellt den Median dar, die obere Linie das Maximum und die untere Linie das Minimum. Y-Achse: Gelsolinkonzentration im Serum in µg/ml. (*CIS = klinisch isoliertes Syndrom; MS = Multiple Sklerose)*

Beurteilung: Im T-Test zeigte sich der p-Wert 0,326. Somit besteht kein signifikanter Unterschied der Gelsolinkonzentration im Serum zwischen MS-Patienten und CIS-Patienten.

3.5 Zusammenhang zwischen dem EDSS und der Gelsolinkonzentration

Der EDSS wurde regelmäßig bei den Visiten vom behandelnden Arzt erhoben und dokumentiert. Insgesamt konnten bei den 22 Patienten während dem Beobachtungszeitraum von 2006 bis 2011 im RKU 124 EDSS-Werte erhoben werden. Dabei befanden sich 50 % der erhobenen EDSS-Werte zwischen 0 und 1. 40 % der EDSS-Werte befanden sich zwischen 1,5 und 2.

Tabelle 10 – EDSS: Zwischen 2006 und 2011 wurden in der Klinik für Neurologie des Universitätsklinikums Ulm 22 Patienten mit einem CIS oder einer MS untersucht. Bei diesen Patienten wurden während der gesamten Beobachtungszeit 124 EDSS-Werte erhoben.
(n = Anzahl, EDSS = Expanded disability status scale)

		[n = 124]
EDSS	Mittelwert:	1,1 (± 1,09)
	Median:	1,1
	Minimum:	0
	Maximum:	6,5

Um eine mögliche Abhängigkeit zwischen dem EDSS und der Gelsolinkonzentration im Serum zu erkennen, wurden von den insgesamt erhobenen 124 EDSS Werten 107 mit einem zu diesem Zeitpunkt gemessenen Gelsolinwert korreliert.

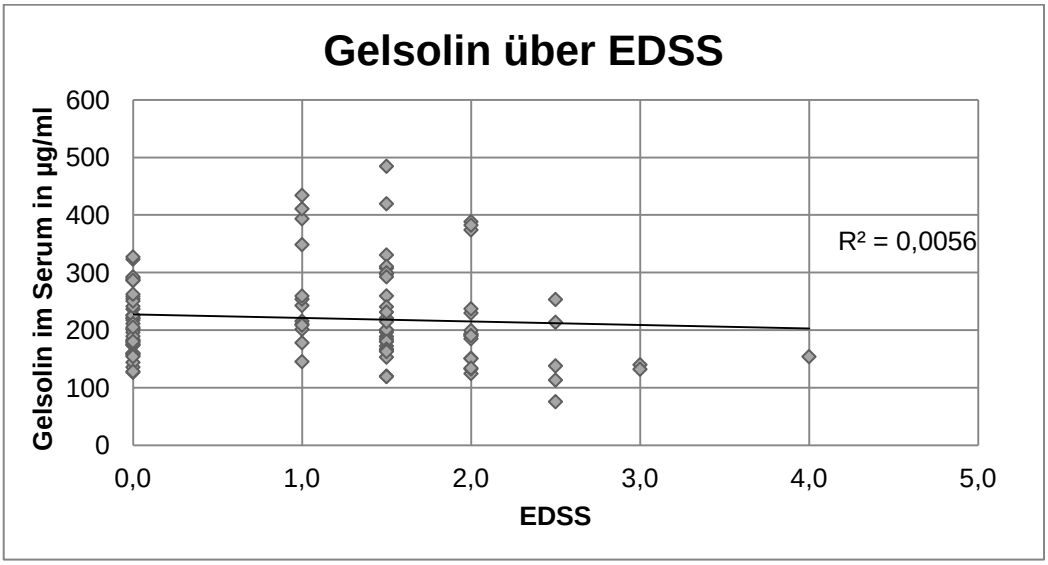


Abbildung 4 – Streudiagramm Gelsolinkonzentration im Serum über EDSS. Zwischen 2006 und 2011 wurden in der Klinik für Neurologie des Universitätsklinikums Ulm 22 Patienten mit einem CIS oder einer MS untersucht. Von diesen 22 Patienten wurden 107 Gelsolinkonzentrationen im Serum über die entsprechenden EDSS-Werte im Diagramm aufgetragen. Die EDSS-Werte wurden vom behandelnden Arzt zu regelmäßigen Visiten erhoben. Durch das Diagramm soll anhand der Regressionsgeraden ein möglicher Zusammenhang zwischen der Gelsolinkonzentration im Serum und dem EDSS-Wert überprüft werden. Y-Achse: Gelsolinkonzentration im Serum in µg/ml; X-Achse: EDSS-Werte von 1-5. (*EDSS = Expanded Disability Status Scale, CIS = klinisch isoliertes Syndrom; MS = Multiple Sklerose)*

Beurteilung:

In dem Streudiagramm (Abbildung 4) zeigt sich eine abfallende Regressionsgerade mit R^2= 0,00559. Der Korrelationskoeffizient nach Pearson zeigte mit 0,0748 keinen Zusammenhang zwischen der Gelsolinkonzentration im Serum und dem EDSS-Wert.

3.6 Zusammenhang zwischen T2-Läsionen und der Gelsolinkonzentration

Alle 22 Patienten erhielten in sechs- bis zwölfmonatigen Abständen zerebrale MRT-Bildgebungen. Die Anzahl der T2-Läsionen wurde bei der Auswertung einzeln quantitativ erhoben. Insgesamt wurden 104 zerebrale MRT-Aufnahmen ausgewertet.

Tabelle 11 – Auswertung der cMRT-Bildgebung. Zwischen 2006 und 2011 wurden in der Klinik für Neurologie des Universitätsklinikums Ulm 22 Patienten mit einem CIS oder einer MS untersucht. Bei 21 von 22 Patienten zeigten sich T2-Läsionen im cMRT. Während des Beobachtungszeitraums wurden bei den Patienten insgesamt 104 MRT-Aufnahmen angefertigt und für die vorliegende Arbeit gesichtet und ausgewertet. (*cMRT = zerebrale Magnetresonanztomographie, n = Anzahl, Gd = Gadolinium; SD = Standardabweichung CIS = klinisch isoliertes Syndrom; MS = Multiple Sklerose)*

	Patienten	**[n = 22]**	
Anzahl der Patienten mit T2-Läsionen, *n (%)*		21	(95,5)

	cMRT	**[n = 104]**	
T2-Läsionen, *n (SD)*	Mittelwert:	14 (± 13,28)	
	Median:	9	
	Minimum:	0	
	Maximum:	45	
MRT mit Gd-Gabe, *n (%)*	Anzahl:	98	(94%)
MRT mit Gd-Aufnahme, *n (%)*	Anzahl:	37	(38%)
Gd-aufnehmende Läsionen, *n*	Mittelwert:	3	
	Median:	2	
	Minimum:	1	
	Maximum:	15	

Bei 78 von 104 MRT-Aufnahmen wurde zum gleichen Zeitpunkt eine Probe zur Bestimmung der Gelsolinkonzentration im Serum gewonnen. Um einen möglichen Zusammenhang zwischen der Gelsolinkonzentration im Serum und den T2-Läsionen zu überprüfen, wurden die entsprechenden Werte in einem Streudiagramm verbildlicht.

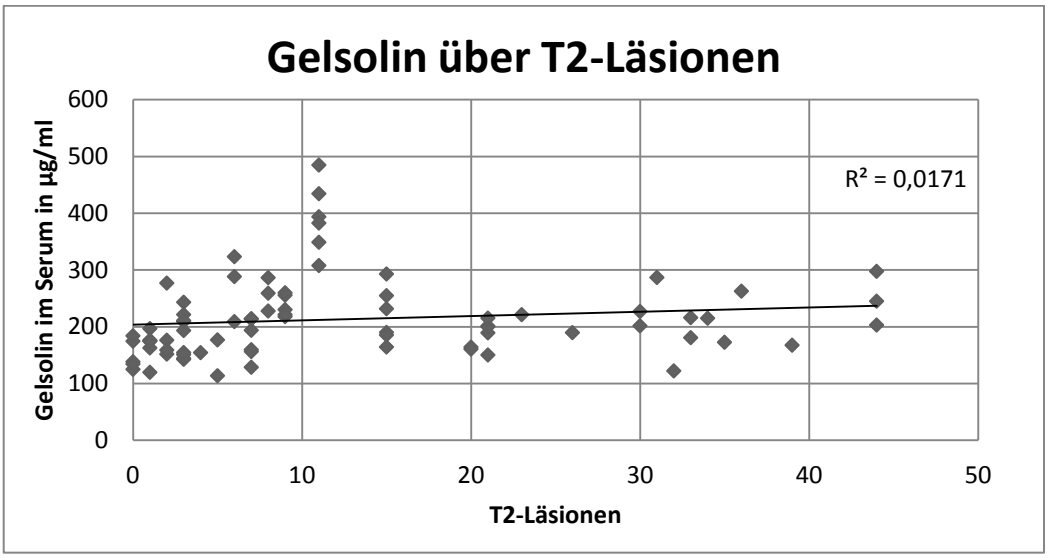


Abbildung 5 – Streudiagramm Gelsolinkonzentration im Serum über T2-Läsionen im cMRT. Zwischen 2006 und 2011 wurden in der Klinik für Neurologie des Universitätsklinikums Ulm 22 Patienten mit einem CIS oder einer MS untersucht. Diese Patienten erhielten während des Beobachtungszeitraums im sechs- bis zwölfmonatigen Intervall ein cMRT. Die T2-Läsionen wurden quantitativ erfasst. Zeitgleich zur MRT-Bildgebung wurden Serumproben gewonnen. Hieraus erfolgte die Bestimmung der Gelsolinkonzentration. Anschließend wurden die Wertepaare im Streudiagramm aufgetragen um anhand der Regressionsgeraden einen möglichen Zusammenhang zwischen der Gelsolinkonzentration im Serum und den T2-Läsionen zu überprüfen. Y-Achse: Gelsolinkonzentration im Serum in µg/ml; X-Achse: Anzahl der T2-Läsionen von 78 MRT-Aufnahmen. *(cMRT = cerebrale Magnetresonanztomographie; CIS = klinisch isoliertes Syndrom; MS = Multiple Sklerose)*

Beurteilung: In dem Streudiagramm (Abbildung 5) zeigt sich eine ansteigende Regressionsgerade mit R^2= 0,01707. Der Korrelationskoeffizient nach Pearson zeigte mit 0,130767 keinen Zusammenhang zwischen der Gelsolinkonzentration im Serum und den T2-Läsionen in der zerebralen MRT-Bildgebung.

3.7 Zusammenhang zwischen einem Schub und der Gelsolinkonzentration

Alle Schübe, die die Patienten während des Beobachtungszeitraums hatten, wurden anhand der Arztbriefe ermittelt. Die 22 Patienten hatten während des Zeitraums zwischen 2006 und 2011 insgesamt 43 Schübe.

Zehn Patienten hatten nach dem Erstereignis keinen weiteren Schub. Ein Patient zeigte sechs weitere Schübe auf.

77 % der Patienten hatten insgesamt 0 bis 2 Schübe während des Beobachtungszeitraums.

Tabelle 12 – Schubhäufigkeit und vorhandene Gelsolinkonzentration im Serum zum Zeitpunkt des Schubes. Zwischen 2006 und 2011 wurden in der Klinik für Neurologie des Universitätsklinikums Ulm 22 Patienten mit einem CIS oder einer MS untersucht. Bei insgesamt 149 Visiten aller Patienten konnten 43 Schübe während den Visiten erfasst werden. Die Visiten fanden stets in einem Intervall zwischen sechs und zwölf Monaten statt. Zu den Visiten wurden Serumproben gewonnen, um aus diesen die Gelsolinkonzentration zu bestimmen. Dabei waren nicht zu jedem erfassten Schubereignis Proben vorhanden. *(CIS = klinisch isoliertes Syndrom; MS = Multiple Sklerose)*

	Schub während des Beobachtungszeitraums	**[n = 43]**
Gelsolinproben, *n*	vorhanden	27
	nicht vorhanden	16

	Kein Schub während des Beobachtungszeitraums	**[n = 106]**
Gelsolinproben, *n*	vorhanden	106

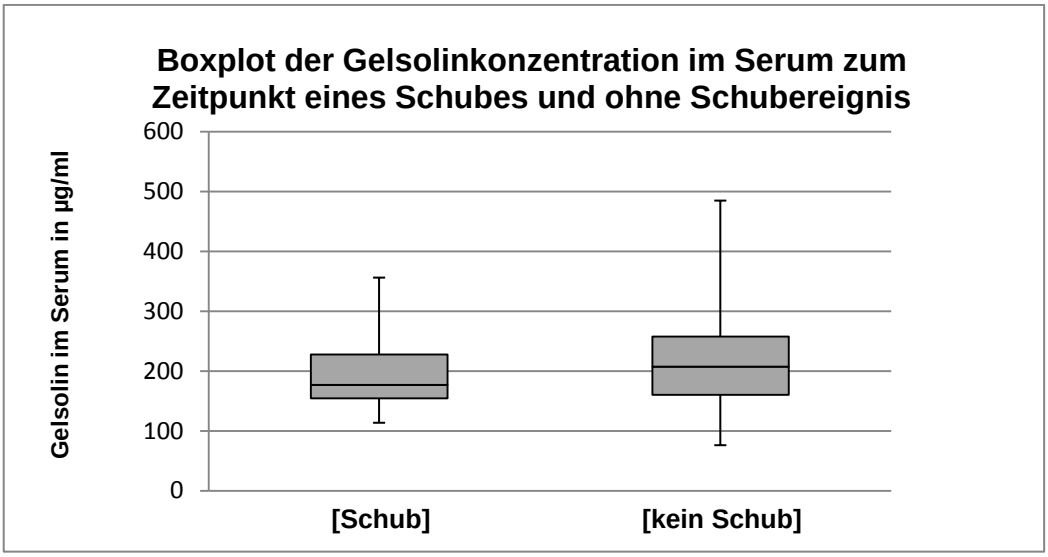


Abbildung 6 – Boxplot der Gelsolinkonzentration im Serum zum Zeitpunkt eines Schubes und zum Zeitpunkt ohne Schubereignis. Zwischen 2006 und 2011 wurden in der Klinik für Neurologie des Universitätsklinikums Ulm 22 Patienten mit einem CIS oder einer MS untersucht. In diesem Beobachtungszeitraum wurden 27 Schübe erfasst, bei denen gleichzeitig eine Serumprobe gewonnen werden konnte. Aus diesen Serumproben wurde die Gelsolinkonzentration bestimmt und im Boxplot [Schub] dargestellt. Demgegenüber gestellt sind im Boxplot [kein Schub] die Gelsolinkonzentrationen von 106 Serumproben, welche bei Visiten gewonnen wurden, bei denen die untersuchten Patienten keinen Schub hatten. Die Mittellinie der Box stellt den Median dar, die obere Linie das Maximum und die untere Linie das Minimum. Y-Achse: Gelsolinkonzentration im Serum in µg/ml. (*CIS = klinisch isoliertes Syndrom; MS = Multiple Sklerose)*

Beurteilung: Im T-Test zeigte sich ein p-Wert von 0,074223. Somit besteht kein signifikanter Unterschied der Gelsolinkonzentration im Serum zum Zeitpunkt eines Schubes und im schubfreien Intervall.

3.8 Zusammenhang zwischen einer immunmodulierenden Therapie und der Gelsolinkonzentration

Insgesamt erhielten 64 % der Patienten eine immunmodulierende Therapie während des Beobachtungszeitraums. Der Zeitpunkt für den Beginn einer immunmodulierenden Therapie war unterschiedlich. Einige Patienten erhielten sehr früh nach der Diagnosestellung eine Therapie, andere hingegen erst nach einigen Jahren. Acht Patienten erhielten im Beobachtungszeitraum keine Immunmodulation.

Alle 22 Patienten hatten bei der ersten Vorstellung in der Neurologie des Rehabilitations- und Universitätsklinikums Ulm eine akute neurologische Symptomatik. Deshalb erhielten sie zu Beginn des Beobachtungszeitraums eine Cortisonstoßtherapie mit 1000 mg Methylprednisolon für drei bis fünf Tage.

Tabelle 13 – Immunmodulierende Therapien: Zwischen 2006 und 2011 wurden in der Klinik für Neurologie des Universitätsklinikums Ulm 22 Patienten mit einem CIS oder einer MS wiederholt untersucht. 14 Patienten erhielten während des Beobachtungszeitraums eine immunmodulierende Therapie. Die jeweiligen Therapien wurden bei den Visiten erfasst. (*n = Anzahl, s.c. = subcutan, i.m. = intramuskulär, CIS = klinisch isoliertes Syndrom; MS = Multiple Sklerose))*

Wirkstoff	Handelsname	[n = 14]
Glatirameracetat	Copaxone 20 mg tägl. s.c.	6
Interferon beta-1a	Rebif 22 µg 3x wöchentlich s.c.	4
	Avonex 30 µg 1x wöchentlich i.m.	1
Interferon beta-1b	Betaferon 250 µg/ml alle 2 Tage s.c.	2
Natalizumab	Tysabri Infusion 300 mg alle 4 Wochen	1

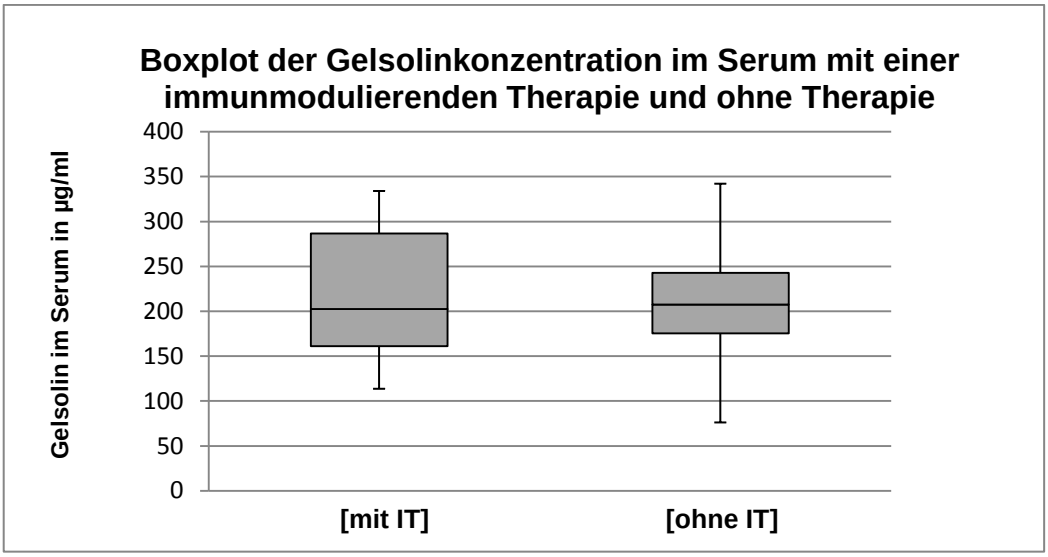


Abbildung 7 – Boxplot der Gelsolinkonzentration im Serum mit einer immunmodulierenden Therapie und ohne Therapie. Zwischen 2006 und 2011 wurden in der Klinik für Neurologie des Universitätsklinikums Ulm 22 Patienten mit einem CIS oder einer MS untersucht. In diesem Zeitraum wurden wiederholt Serumproben von den Patienten gewonnen. Aus diesen Proben konnten insgesamt 114 Gelsolinkonzentrationen bestimmt werden. Im Boxplot [mit IT] sind 60 Gelsolinkonzentrationen dargestellt. Diese wurden aus Proben von Patienten bestimmt, die zum Zeitpunkt der Probengewinnung eine immunmodulierende Therapie erhielten. Im Boxplot [ohne IT] sind entsprechend die 54 Gelsolinkonzentrationen dargestellt, welche aus Proben von Patienten bestimmt wurden, die zum Zeitpunkt der Probengewinnung keine immunmodulierende Therapie erhielten. Die Mittellinie der Box stellt den Median dar, die obere Linie das Maximum und die untere Linie das Minimum. Y-Achse: Gelsolinkonzentration im Serum in µg/ml. (*CIS = klinisch isoliertes Syndrom; MS = Multiple Sklerose; IT = immunmodulierende Therapie)*

Beurteilung: Im T-Test zeigte sich ein p-Wert von 0,313123. Somit besteht kein signifikanter Unterschied der Gelsolinkonzentration im Serum bei Patienten mit einer immunmodulierenden Therapie und bei Patienten ohne Therapie.

3.9 Zusammenhang zwischen der Krankheitsdauer und der Gelsolinkonzentration

Alle 22 Patienten wurden in sechs- bis zwölfmonatigen Abständen untersucht. Dabei wurde regelmäßig Serum abgenommen. Daraus erfolgte die Bestimmung der Gelsolinkonzentration. Insgesamt konnten 135 Gelsolinkonzentrationen bestimmt werden.

Bei 59 % der Patienten konnten sieben und mehr Gelsolinkonzentrationen gemessen werden. Die kürzeste beobachtete Krankheitsdauer waren 14 Monate, die längste 63 Monate. Da bei zwei Patienten nur zwei Proben zur Analyse zur Verfügung standen, erfolgte bei diesen keine Verlaufsdarstellung.

Durch die Darstellung der Verläufe soll eine mögliche sichtbare Tendenz festgestellt werden.

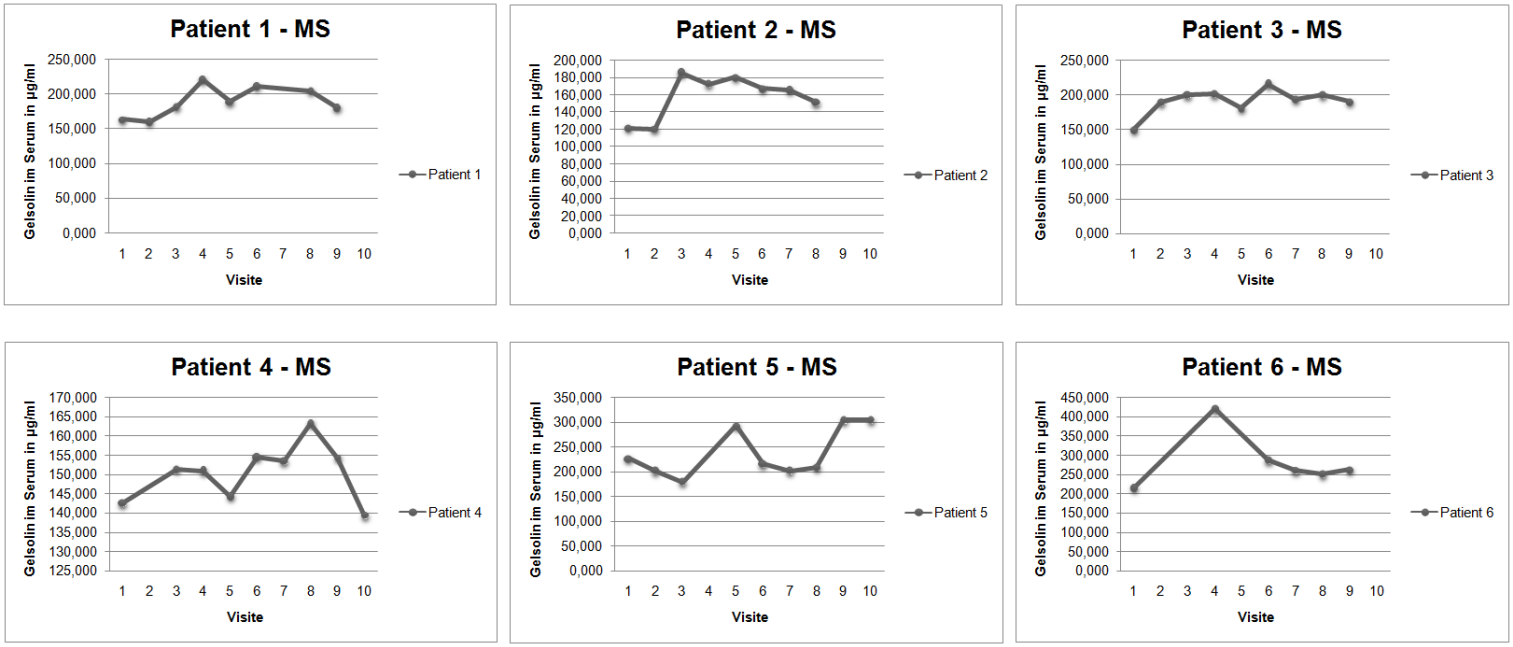
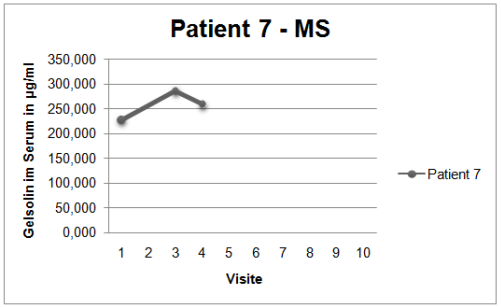
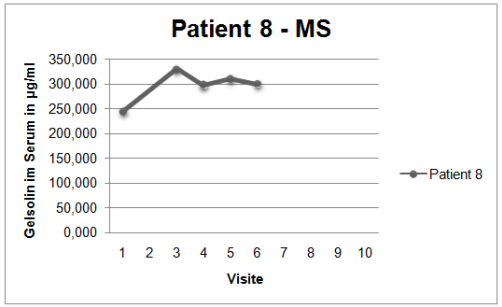
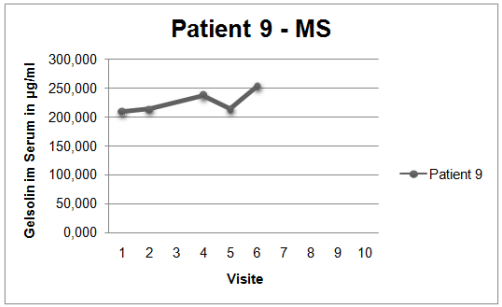


Abbildung 8 – Gelsolinkonzentration im Serum im zeitlichen Verlauf von sechs Patienten mit der initialen Diagnose MS. Zwischen 2006 und 2011 wurden in der Klinik für Neurologie des Universitätsklinikums Ulm 22 Patienten mit einem CIS oder einer MS untersucht. Diese stellten sich wiederholt in sechs- bis zwölfmonatigen Abständen zu Visiten vor. Dabei wurden Serumproben gewonnen. Bei manchen Visiten konnte keine Probe gewonnen werden oder es war keine Rückstellprobe vorhanden. Diese fehlenden Gelsolinkonzentrationen zu den jeweiligen Visiten sind mit fehlenden Punkten bei der entsprechenden Visite im Diagramm gekennzeichnet. 1 auf der X-Achse stellt den Zeitpunkt der diagnostischen Erstpunktion dar. Die folgenden Zahlen entsprechen den geplanten Visiten. Y-Achse: Gelsolinkonzentration im Serum in µg/ml. X-Achse: zeitlicher Verlauf der Visiten. *(MS = Multiple Sklerose)*







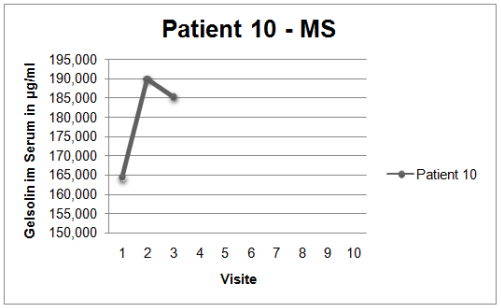


Abbildung 9 – Gelsolinkonzentration im Serum im zeitlichen Verlauf von vier Patienten mit der initialen Diagnose MS. Zwischen 2006 und 2011 wurden in der Klinik für Neurologie des Universitätsklinikums Ulm 22 Patienten mit einem CIS oder einer MS untersucht. Diese stellten sich wiederholt in sechs- bis zwölfmonatigen Abständen zu Visiten vor. Dabei wurden Serumproben gewonnen. Bei manchen Visiten konnte keine Probe gewonnen werden oder es war keine Rückstellprobe vorhanden. Diese fehlenden Gelsolinkonzentrationen zu den jeweiligen Visiten sind mit fehlenden Punkten bei der entsprechenden Visite im Diagramm gekennzeichnet. 1 auf der X-Achse stellt den Zeitpunkt der diagnostischen Erstpunktion dar. Die folgenden Zahlen entsprechen den geplanten Visiten. Y-Achse: Gelsolinkonzentration im Serum in µg/ml. X-Achse: zeitlicher Verlauf der Visiten. *(MS = Multiple Sklerose)*

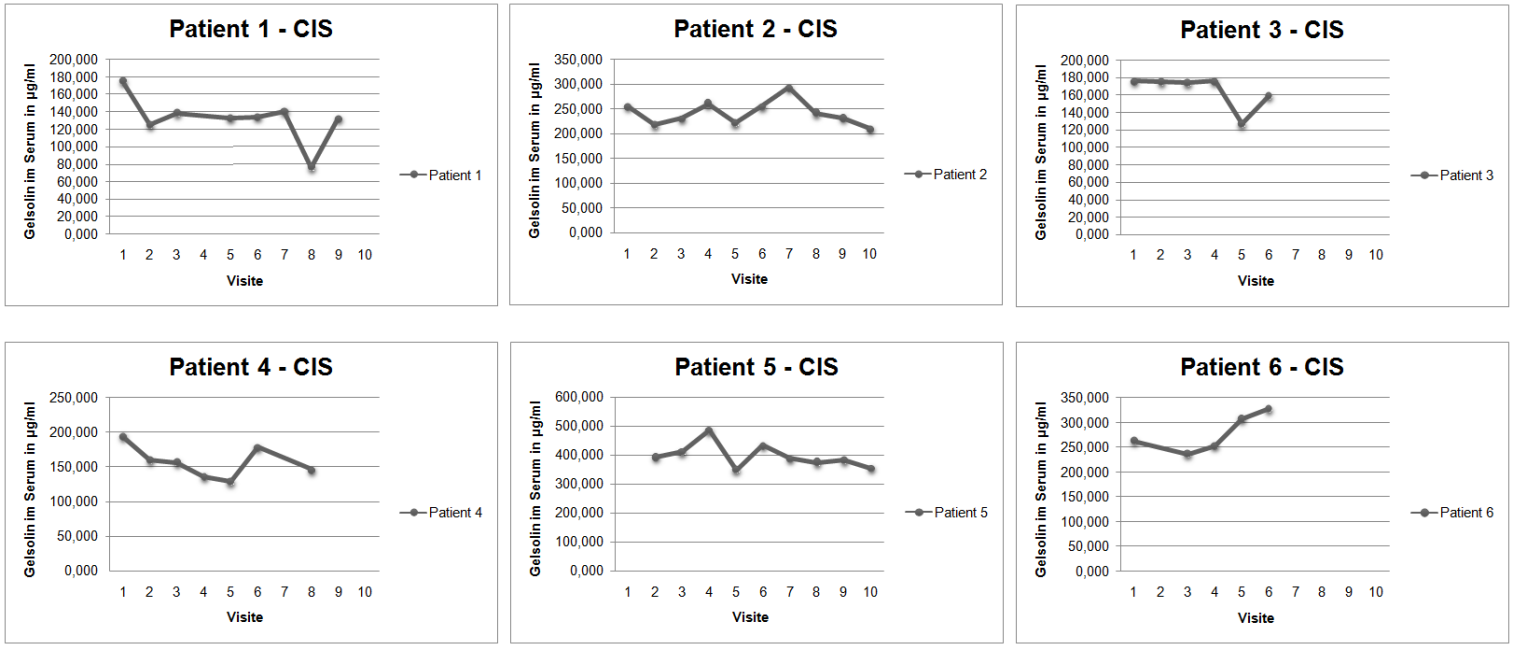
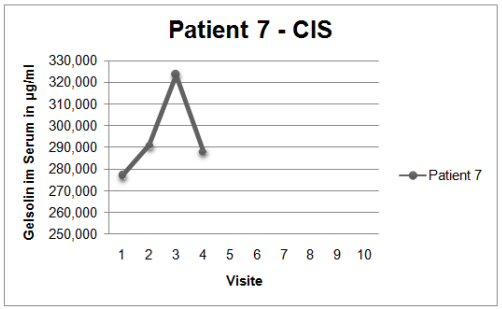
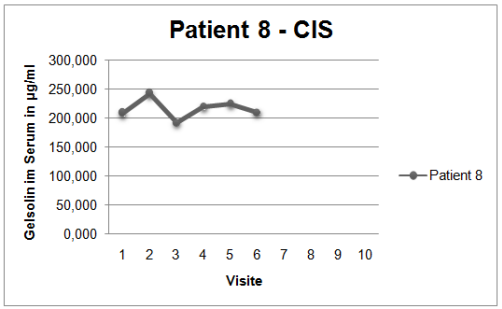
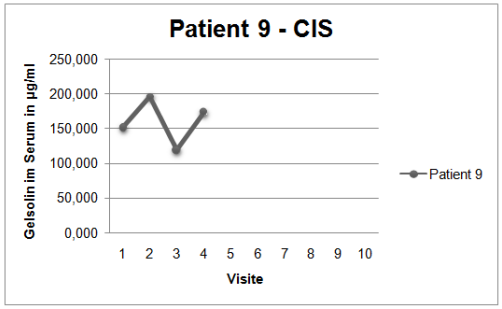


Abbildung 10 – Gelsolinkonzentration im Serum im zeitlichen Verlauf von sechs Patienten mit der initialen Diagnose CIS. Zwischen 2006 und 2011 wurden in der Klinik für Neurologie des Universitätsklinikums Ulm 22 Patienten mit einem CIS oder einer MS untersucht. Diese stellten sich wiederholt in sechs- bis zwölfmonatigen Abständen zu Visiten vor. Dabei wurden Serumproben gewonnen. Bei manchen Visiten konnte keine Probe gewonnen werden oder es war keine Rückstellprobe vorhanden. Diese fehlenden Gelsolinkonzentrationen zu den jeweiligen Visiten sind mit fehlenden Punkten bei der entsprechenden Visite im Diagramm gekennzeichnet. 1 auf der X-Achse stellt den Zeitpunkt der diagnostischen Erstpunktion dar. Die folgenden Zahlen entsprechen den geplanten Visiten. Patient 3 konvertierte im Gegensatz zu den anderen Patienten im Verlauf des Beobachtungszeitraums nicht zu einer MS. Y-Achse: Gelsolinkonzentration im Serum in µg/ml. X-Achse: zeitlicher Verlauf der Visiten. *(CIS = klinisch isoliertes Syndrom; MS = Multiple Sklerose)*







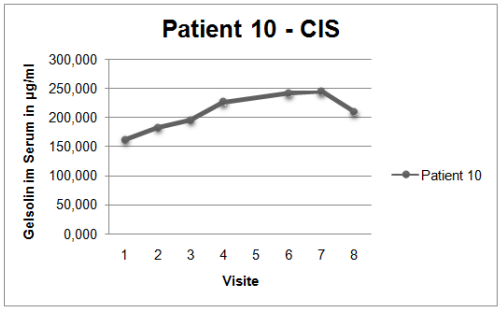


Abbildung 11 – Gelsolinkonzentration im Serum im zeitlichen Verlauf von vier Patienten mit der initialen Diagnose CIS. Zwischen 2006 und 2011 wurden in der Klinik für Neurologie des Universitätsklinikums Ulm 22 Patienten mit einem CIS oder einer MS untersucht. Diese stellten sich wiederholt in sechs- bis zwölfmonatigen Abständen zu Visiten vor. Dabei wurden Serumproben gewonnen. Bei manchen Visiten konnte keine Probe gewonnen werden oder es war keine Rückstellprobe vorhanden. Diese fehlenden Gelsolinkonzentrationen zu den jeweiligen Visiten sind mit fehlenden Punkten bei der entsprechenden Visite im Diagramm gekennzeichnet. 1 auf der X-Achse stellt den Zeitpunkt der diagnostischen Erstpunktion dar. Die folgenden Zahlen entsprechen den geplanten Visiten. Patient 8 und 10 konvertierten im Gegensatz zu den anderen Patienten im Verlauf des Beobachtungszeitraums nicht zu einer MS. Y-Achse: Gelsolinkonzentration im Serum in µg/ml. X-Achse: zeitlicher Verlauf der Visiten. *(CIS = klinisch isoliertes Syndrom; MS = Multiple Sklerose)*

Beurteilung: Die Ausgangswerte der Gelsolinkonzentrationen im Serum sind bei jedem Patienten unterschiedlich. Es ist jedoch im zeitlichen Verlauf eine gewisse Tendenz zu erkennen. Insgesamt zeigt sich bei einigen Patienten zunächst eine Reduktion der Gelsolinkonzentration im Serum (3 von 10 Patienten mit einer MS; 5 von 10 Patienten mit einem CIS).
Bei allen Patienten mit einer MS zeigt sich im weiteren zeitlichen Verlauf ein Anstieg der Gelsolinkonzentration über den individuellen Ausgangswert, welcher zum Zeitpunkt der diagnostischen Erstpunktion bestimmt wurde. Dieser Anstieg erfolgt zwischen der zweiten und sechsten Visite, d.h. nach 6-36 Monaten.

Bei den Patienten die ein CIS hatten, zeigt sich bei acht von zehn Patienten im weiteren zeitlichen Verlauf ein Anstieg über den individuellen Ausgangswert hinaus. Auch dieser Anstieg erfolgt nach 6-36 Monaten. Bei zwei Patienten (Patient 1 und Patient 4) kommt es zu keinem Anstieg.

Die Patienten 3 (Abbildung 10), 8 und 10 (Abbildung 11) mit einem CIS konvertierten während des Beobachtungszeitraums nicht zu einer MS. Tendenziell zeigen diese eine etwas konstantere Gelsolinkonzentration im Serum im zeitlichen Verlauf.

4. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wird untersucht, ob Gelsolin als Biomarker bei der MS Verwendung finden kann. Dabei ist ein wesentlicher Vorteil, dass Gelsolin auch im Serum bestimmt werden kann und somit möglicherweise einen leicht zugänglichen Biomarker darstellt. Somit könnte Gelsolin bei der MS als ein prognostischer Marker und zum Therapiemonitoring dienen.

Es konnte in früheren Arbeiten beobachtet werden, dass Gelsolin bei MS-Patienten eine niedrigere Gelsolinkonzentration im Serum aufweisen, als bei einer gesunden Kontrollgruppe (Kulakowska A et al. 2010).
Welche Faktoren dabei Einfluss auf die gemessenen Gelsolinkonzentrationen im Serum haben könnten, soll anhand dieser Arbeit untersucht werden. Hierbei wurden zur Hypothesenentwicklung, bei der MS etablierte klinische und diagnostische Methoden verwendet, um eine Korrelation mit der Gelsolinkonzentration zu überprüfen.

4.1 Diskussion der Methodik

Patientengut, Zeitraum und Visiten

Es wurden 22 Patienten wiederholt untersucht, wodurch sich ein übergreifender Beobachtungszeitraum von zirka 69 Krankheitsjahren ergibt. Der beobachtete Verlauf eines jeden Patienten ist jedoch individuell unterschiedlich. Dabei gibt es Patienten die 14 Monate in der Studie beobachtet wurden und andere über 64 Monate. Hieraus resultieren im Durchschnitt sechs Visiten mit einer Spannbreite von drei bis neun Visiten.
Es ist von einer Selektionsverzerrung (selection bias) auszugehen. Möglicherweise sind die weniger betroffenen Patienten seltener zu den Visiten erschienen oder bei klinisch unauffälligem Verlauf gar nicht mehr. Dadurch sind diese tendenziell geringer betroffenen Patienten wahrscheinlich in der vorliegenden Arbeit weniger berücksichtigt. Umgekehrt sind die schwerer betroffenen Patienten wahrscheinlich überrepräsentiert.

Um die Selektionsverzerrung zu reduzieren, wäre es nötig gewesen bei allen Patienten einen festgelegten Beobachtungszeitraum zu definieren. Dadurch hätte der Zeitraum in der vorliegenden Arbeit auf 14 Monate festgelegt werden können.
Infolgedessen wäre jedoch die Datenmenge bedeutend verringert worden, wodurch ein Zusammenhang hätte weniger wahrscheinlich detektiert werden können. Aufgrund der bisherigen Kenntnisse über Gelsolin ist davon auszugehen, dass sich ein möglicher Zusammenhang eher bei den mehr betroffenen Patienten zeigen müsste. Deshalb ist die mögliche Selektionsverzerrung in der vorliegenden Arbeit nur bedingt negativ zu bewerten, da durch diesen eine Hypothesenentwicklung wahrscheinlicher werden könnte. In einer entsprechenden Folgeuntersuchung müsste diese Hypothese schließlich mit einer repräsentativen homogenen Gruppe von MS-Patienten überprüft werden.
Somit wäre ein kürzerer Beobachtungszeitraum, bei dem die gesünderen Patienten verstärkt repräsentiert wären, möglicherweise sogar nachteilig für die Zielsetzung der vorliegenden Arbeit gewesen.

Demographie

Bei Einschluss in die Untersuchung waren die Patienten zwischen 17 und 56 Jahre alt. Der mediane Altersdurchschnitt lag bei 26 Jahren und entspricht der in der Literatur beschriebenen epidemiologischen Altersverteilung bei Ausbruch der Erkrankung. Dieser liegt dementsprechend zwischen dem 20. und 40. Lebensjahr (Merkelbach S et al. 2000). Das Verhältnis von Frauen zu Männern in der untersuchten Gruppe entspricht mit 1:1,75 nicht der in der Literatur beschriebenen epidemiologischen Geschlechterverteilung bei MS (Merkelbach S et al. 2000).

Krankheitsverläufe der untersuchten Patienten

Die Patienten waren in unterschiedlichen Krankheitsstadien. Die Hälfte der Patienten hatte bereits zu Beginn der Studie eine MS, die andere Hälfte hatte hingegen ein CIS. Am Ende des Beobachtungszeitraums hatten nur noch drei Patienten die Diagnose eines CIS. Somit konnten zum Zeitpunkt des Einschlusses die Gelsolinkonzentrationen im Liquor und Serum zwischen Patienten mit CIS und MS verglichen werden.

Die Krankheitsaktivität war bei den untersuchten 22 Patienten unterschiedlich. Einige der Patienten hatten während des gesamten Beobachtungszeitraums kein

Schubereignis, manche hatten bis zu sechs Schübe. Im Durchschnitt hatten alle Patienten zwei Schübe während des fünfjährigen Beobachtungszeitraums.
Auch die Anzahl der T2-Läsionen im zerebralen MRT zeigten große Unterschiede. Während einige Patienten keine T2-Läsionszunahme im cMRT hatten, konnte bei mehr als der Hälfte aller Patienten eine Zunahme der T2-Läsionen gesehen werden und unterschiedlich häufig auch eine Aufnahme von Kontrastmittel. Somit konnte in der vorliegenden Arbeit der Einfluss der Krankheitsaktivität auf die Gelsolinkonzentration im Serum überprüft werden.

Gelsolin im Kontext anderer Faktoren

Wie in Kapitel 1.2 erwähnt, hat das Protein eine Vielzahl an Funktionen, so ist es zum Beispiel bei Entzündungsvorgängen und Apoptose involviert (Bucki R et al. 2008; Koya et al. 2000). Somit unterliegt die Gelsolinkonzentration im Serum aufgrund bestehender Ergebnisse wahrscheinlich vielfältigen Einflüssen, weshalb die Komorbidität der untersuchten Patienten möglichst gering sein sollte. Die untersuchten Patienten hatten teilweise weitere Diagnosen, die die Gelsolinkonzentration beeinflussen könnten. Bei einem Teil der Patienten kann man somit sicher von einem Einfluss auf die Gelsolinkonzentration im Serum aufgrund anderer Erkrankungen ausgehen. Aber auch bei denjenigen Patienten, ohne bekannte weitere Diagnosen, ist von einem Einfluss auf die Gelsolinkonzentration durch andere Faktoren wahrscheinlich. Dies muss bei der Bewertung der Ergebnisse berücksichtigt werden. Deshalb ist schlussfolgernd davon auszugehen, dass sich nur ein starker Zusammenhang zwischen den klinisch und diagnostisch gemessenen Parametern und einer MS auf die Gelsolinkonzentration im Serum zeigt.

Immunmodulierende Therapie

64 % der Patienten erhielten eine immunmodulierende Therapie. Die eingesetzten Therapien waren nicht einheitlich. Es ist von unterschiedlichen Einflüssen der verschiedenen immunmodulierenden Therapien auf die Gelsolinkonzentration auszugehen. Um einen generellen Einfluss zu überprüfen, wurde die Gruppe der Patienten mit Therapie und ohne verglichen. Hier zeigte sich kein signifikanter Unterschied in der Gelsolinkonzentration im Serum. Es ist zugleich wahrscheinlich, dass die stärker betroffenen Patienten behandelt wurden. Somit könnte der fehlende Unterschied auch als Therapieerfolg gewertet werden. Um dies zu

überprüfen, wäre es sinnvoll, von Patienten mit gleicher Therapie in einer Längsschnittuntersuchung Gelsolinkonzentration zu erheben, um eine Änderung von dieser unter Therapie zu detektieren. Wünschenswert wäre ein Einschluss vor Beginn der Therapie, um einen aussagekräftigen Ausgangswert zu haben.

Gelsolinmessverfahren

Die Messung der Gelsolinkonzentration erfolgte, wie in Kapitel 2.5.1 beschrieben, nach der Sandwich-ELISA Technik. Der eingesetzte ELISA wurde in der Forschungseinrichtung des Universitätsklinikums Ulm im Liquorlabor der Klinik für Neurologie hergestellt. Die Gelsolinkonzentration der 135 Serumproben und 21 Liquorproben wurden jeweils mit derselben Methodik bestimmt. Es musste für jede Probenplatte wiederholt das komplette Kit nach zuvor festgelegtem, erprobtem und standardisiertem Verfahren hergestellt werden, ebenso wie Lösungen mit den nötigen Mischverhältnissen. Die Inkubationszeit, Temperatur und Waschvorgänge wurden ebenfalls festgelegt und standardisiert.
Trotz höchster Sorgfalt bei den Messungen und Bemühung höchster Genauigkeit bei der Durchführung, können diese Parameter nie exakt gleich sein. Im Vergleich dazu sind kommerziell erhältliche fertige Kits wahrscheinlich weniger fehleranfällig.

Vor der Durchführung der eigentlichen Messung der Patientenproben, wurde das Testverfahren zunächst überprüft. Hierzu wurden zufällig ausgewählte Patientenproben mit dem Testverfahren gemessen. Dieselben Proben wurden wiederholt gemessen um Ergebnisunterschiede, bedingt durch das Messverfahren selbst zu detektieren und weitestgehend zu eliminieren. Hierbei wurden die Zeiten, die Verdünnung der Proben und die Verdünnung der eingesetzten Lösungen optimiert. Die Genauigkeit der wiederholten Messergebnisse der Gelsolinkonzentration im Serum war durch das optimierte Testverfahren sehr gut. Das Testverfahren für die Gelsolinmessungen im Liquor war etwas weniger präzise. Da der Fokus der vorliegenden Arbeit auf Gelsolin im Serum als leicht zugänglicher Biomarker lag, wurde der ELISA in Hinblick auf die Genauigkeit entsprechend für Serumproben optimiert und die höhere Messungenauigkeit für Liquor toleriert.

Gelsolinkonzentration im Serum

In der Arbeit von Kulakowska et al. 2010 zeigte sich eine signifikante Reduktion der Gelsolinkonzentration im Serum bei Patienten mit MS. Hier wurden bei 56 Patienten mit MS Konzentrationen von 115 ±78 µg/ml im Gegensatz zu der Kontrollgruppe mit 244 ±96 µg/ml gemessen. Dabei befanden sich alle Patienten mit MS im frühen Krankheitsstadium mit einem EDSS Wert von 1,5 ±0,6. Alle Patienten hatten die Diagnose einer RRMS und erhielten keine Cortisonstoßtherapie und keine immunmodulierende Therapie. Alle Patienten wiesen positive oligoklonale Banden im Liquor auf (Kulakowska A et al. 2010). Man erkennt, dass im Vergleich zu der vorliegenden Arbeit eine sehr homogene Gruppe im selben Krankheitsstadium untersucht wurde und diese Patienten keine medikamentöse Therapie erhielten. In meiner Untersuchung konnte kein statistisch signifikanter Unterschied der Gelsolin Konzentration im Serum zwischen den Patienten mit einer MS und eines CIS gesehen werden. Jedoch kann festgestellt werden, dass die gemessenen Gelsolinkonzentrationen im Serum zum Zeitpunkt der diagnostischen Erstpunktion in der vorliegenden Arbeit mit 169 µg/ml bei MS-Patienten und mit 185 µg/ml bei CIS-Patienten jeweils niedriger waren als die Gelsolinwerte der gesunden Kontrollgruppe von Kulakowska et al.. Zudem zeigt sich trotz fehlender Signifikanz eine geringere Gelsolinkonzentration im Serum bei MS-Patienten im Vergleich zu CIS-Patienten. Dieses Ergebnis stimmt mit dem von Kulakowska et al. 2010 überein. Die genaue Ursache bleibt jedoch weiterhin unklar. Ein Erklärungsansatz könnte sein, dass es aufgrund der Inflammation und Neurodegeneration zu einer Zellschädigung und Freisetzung von Aktin kommt. Hierdurch wird Gelsolin als Teil des Actin-Scavenger-Systems vermehrt aus der Blutbahn mobilisiert. Dies würde zu einer Senkung der Gelsolinkonzentration im Serum führen (Kulakowska A et al. 2010).

Auch bei anderen chronisch inflammatorischen Erkrankungen konnte eine niedrigere Gelsolinkonzentration im Serum gesehen werden. Osborn et al. 2008 konnte dies bei der Rheumatoiden Arthritis zeigen (Osborn et al. 2008).

Gelsolinkonzentration im Liquor

Auch die Gelsolinkonzentration im Liquor war bei den untersuchten Patienten mit MS gegenüber denen mit einem CIS in der vorliegenden Arbeit niedriger. Hier zeigte sich zudem eine Signifikanz von p= 0,047. Dieses Ergebnis konnte auch bei Kulakowska A et al. 2008 gesehen werden. Die Autoren konnten eine Erniedrigung der Gelsolinkonzentration im Liquor bei Patienten mit einer RRMS im Vergleich zu Patienten mit einer anderen neurologischen Erkrankung zeigen. Dabei zeigte sich eine Gelsolinkonzentration von 2,1 µg/ml ±0,7 im Liquor. In der vorliegenden Arbeit lag die Gelsolinkonzentration im Liquor von 11 MS-Patienten zum Zeitpunkt der diagnostischen Erstpunktion im Durchschnitt bei 3,61 µg/ml ±1,12 und war damit leicht höher als die von Kulakowska et al. bestimmte Konzentration (Kulakowska A et al. 2008). Hierbei muss jedoch angemerkt werden, dass der von Kulakowska A et al. gemessene Durchschnittswert lediglich durch die Gelsolinbestimmung bei vier Patienten ermittelt wurde und somit kritisch betrachtet werden muss. Trotz der kaum höheren Patientenzahl in der vorliegenden Arbeit zeigt sich dennoch ein signifikanter Unterschied der Gelsolinkonzentration im Liquor bei den untersuchten MS-Patienten gegenüber den Patienten mit einem CIS (MS 3,61 µg/ml; CIS 4,5 µg/ml).

Weshalb es bei MS-Patienten zu einer signifikanten Reduktion der Gelsolinkonzentration im Liquor kommt, ist weiterhin unklar.

In diversen Arbeiten wurde postuliert, dass Gelsolin innerhalb des ZNS produziert wird (Kulakowska A et al. 2008). Zudem konnte gezeigt werden, dass die Produktion von Gelsolin durch Oligodendrozyten im ZNS bei Ratten ihr Maximum während der Bildung von neuen Myelinscheiden erreicht (Lena et al. 1994). Dies könnte ein möglicher Erklärungsansatz für die niedrigere Gelsolinkonzentration im Liquor bei MS-Patienten in der vorliegenden Arbeit sein. Der Liquor wurde zum Zeitpunkt der diagnostischen Erstpunktion bestimmt. Zu diesem Zeitpunkt zeigte sich bei den MS-Patienten im Schnitt eine viel größere Läsionslast im cMRT als bei den CIS-Patienten (Mittelwert der Läsionslast bei MS-Patienten: 23,3 Läsionen; Mittelwert der Läsionslast bei CIS-Patienten: 4,4 Läsionen). Durch die bestehende Inflammation und dadurch bedingte Freisetzung von Aktin kann es zu einem Verbrauch von Gelsolin kommen, was die niedrigere Gelsolinkonzentration im Liquor erklären könnte (Dahl 2005).

4.2 Zusammenhang zwischen dem EDSS und der Gelsolinkonzentration

Es wurde in der vorliegenden Arbeit untersucht, ob der durch den EDSS bestimmte Behinderungsgrad bei einer MS einen Einfluss auf die Gelsolinkonzentration im Serum hat.
Eine vergleichbare Arbeit hierzu gibt es in der bestehenden Literatur nicht.

Der EDSS wurde bei jeder Visite im Zeitraum von 2006 bis 2011 von dem untersuchenden Arzt der Neurologie des Universitätsklinikums Ulm festgestellt und dokumentiert. Es konnten 107 Gelsolinkonzentrationen im Serum mit den entsprechenden EDSS Werten korreliert werden.

Bei den untersuchten 22 Patienten konnte kein signifikanter Zusammenhang zwischen der Gelsolinkonzentration im Serum und dem EDSS gesehen werden (Korrelationskoeffizient nach Pearson 0,0748).
Erwartet hätte man bei Patienten mit einem höheren EDSS niedrigere Gelsolinkonzentrationen im Serum. Denn ein höherer EDSS spricht für eine größere Behinderung, was mit einer erhöhten Krankheitsaktivität und somit mit einer verstärkten Neurodegeneration in Verbindung gebracht werden kann (Kurtzke 1983). Wie bereits beschrieben, ist bei Zelluntergang von einer Aktin-Freisetzung und damit einer Reduktion von Gelsolin im Serum auszugehen (Lee WM u. Galbraith RM 1992).

Es zeigt sich auch bei konstantem EDSS zwischen den Visiten eine Änderung der Gelsolinkonzentration im Serum.
Der EDSS gibt eher eine bleibende Neurodegeneration wieder, während die Änderung der Gelsolinkonzentration eher von der akuten Inflammation abhängt (Dutta u. Trapp 2007; Kurtzke 1983). Zudem scheint sich die Gelsolinkonzentration im Serum dynamischer und kurzfristiger zu ändern und unterliegt, wie bereits erwähnt, weiteren Einflüssen (Suhler et al. 1997). Da der EDSS eher ein langfristiger Verlaufsparameter ist, ist es schwierig diesen mit einem sich schnell ändernden Parameter, wie der Gelsolinkonzentration zu korrelieren.

4.3 Zusammenhang zwischen T2-Läsionen und der Gelsolinkonzentration

In der vorliegenden Arbeit wurden insgesamt 104 cMRT-Aufnahmen nach einem zuvor festgelegten Protokoll bezüglich ihrer quantitativen Läsionslast ausgewertet. Bei 78 dieser Aufnahmen wurde zum gleichen Zeitpunkt eine Probe zur Bestimmung der Gelsolinkonzentration im Serum gewonnen, so dass die jeweiligen Ergebnisse korreliert werden konnten. Bisher gibt es in der Literatur keine vergleichbaren Untersuchungen.

Ein signifikanter Zusammenhang zwischen der T2-Läsionslast und der Gelsolinkonzentration im Serum konnte nicht gezeigt werden.

Aufgrund der bestehenden Literatur wäre eine niedrigere Gelsolinkonzentration im Serum bei höherer Anzahl der T2- Läsionen zu erwarten gewesen, weil hier von einem vermehrten Zelluntergang und damit von einem vermehrten Verbrauch an Gelsolin auszugehen ist (Osborn et al. 2008).

Es konnte jedoch beobachtet werden, dass bei Patienten die während des Studienverlaufes keine Veränderungen der Anzahl der T2-Läsionen im cMRT hatten, dennoch Schwankungen der Gelsolinkonzentration im Serum zu sehen waren. Auch dies ist möglicherweise darauf zurückzuführen, dass die Gelsolinkonzentration von multiplen Faktoren abhängt (Bucki R et al. 2008). Zudem ist es wahrscheinlich, dass Gelsolin sensitiver ist. So könnte es bereits zu einer Änderung der Gelsolinkonzentration kommen, während im cMRT noch keine Läsionen zu sehen sind.

Weiterhin wäre es sinnvoll, soweit technisch möglich, das Läsionsvolumen und nicht die Anzahl der Läsionen zu bestimmen. Patienten können zwar wenige Läsionen haben, jedoch ein großes Läsionsvolumen aufweisen. Hierdurch kommt es zu einer großen neuronalen Schädigung, welche sich entsprechend in der Gelsolinkonzentration wiederspiegeln sollte. Für mögliche weitere Arbeiten ist es empfehlenswert, das Läsionsvolumen mit der Gelsolinkonzentration im Serum zu vergleichen. Hiermit könnte eine genauere Aussage bezüglich der Läsionslast und dessen Einfluss auf die Gelsolinkonzentration im Serum getroffen werden. Zudem wäre eine Korrelation zwischen aktiven Gadolinium aufnehmenden Läsionen und der Gelsolinkonzentration interessant, da man bei Gelsolin von einem akuten und dynamischen Marker ausgehen muss und kontrastmittelaufnehmende Läsionen einer akuten Inflammation entsprechen.

4.4 Gelsolinkonzentration bei einem Schub im Vergleich zum schubfreien Intervall und im zeitlichen Verlauf

Es konnten 27 Gelsolinkonzentrationen im Serum zum Zeitpunkt eines Schubes bestimmt werden. Diese zeigen im Vergleich zu den Gelsolinkonzentrationen zum Zeitpunkt ohne Schub keinen signifikanten Unterschied (p= 0,074223).

Zum Zeitpunkt eines Schubes, bei dem von einer starken Immunreaktion auszugehen ist, würde man eine Veränderung, am ehesten eine Reduktion der Gelsolinkonzentration im Serum erwarten. Es muss jedoch berücksichtigt werden, dass 27 Bestimmungen der Gelsolinkonzentration zum Zeitpunkt eines Schubes wenig sind. Zudem ist bisher unklar, in welchem zeitlichen Abstand nach einem Schubereignis eine wahrscheinliche Reduktion der Gelsolinkonzentration im Serum zu detektieren ist. Das diese Reduktion wahrscheinlich ist, kann anhand der Verlaufsdiagramme in Kapitel 3.9 in den Abbildungen 8 bis 11 gesehen werden.

Die Patienten stellten sich in einem Intervall von sechs bis zwölf Monaten zu den Visiten vor. Zu jeder Visite wurde dem Patienten Serum abgenommen. Alle im Serum gemessenen Gelsolinkonzentrationen wurden über den zeitlichen Verlauf für jeden Patienten getrennt aufgetragen. Zudem wurde zwischen Patienten mit einer MS und mit einem CIS unterschieden (Abbildungen 8 bis 11).

Die absolute Konzentrationsschwankung von Gelsolin ist intraindividuell sehr unterschiedlich, ebenso wie die Ausgangskonzentration. Dies erklärt die fehlende Signifikanz, wenn man die Gelsolinkonzentration von den Patienten im Schubereignis, mit den Konzentrationen ohne Schub vergleicht. Bei Betrachtung der Diagramme zeigt sich jedoch die Tendenz, dass es bei allen MS-Patienten und bei acht von zehn Patienten mit einem CIS im weiteren zeitlichen Verlauf zu einem Anstieg der Gelsolinkonzentration, im Vergleich zum individuellen Ausgangswert, kommt. Daraus lässt sich möglicherweise indirekt ein meist nicht erfasster Abfall zum Schubereignis ableiten. Deshalb wäre es hilfreich, einen Ausgangswert vor Erkrankungsbeginn zu haben. Theoretisch ist bei allen ein initialer Abfall der Gelsolinkonzentration zu erwarten und bei Rückgang der Inflammation ein erneuter Anstieg, so wie es in Kapitel 3.9 in den Diagrammen zu sehen ist. In der Arbeit von Lena et al. 1994 konnte gezeigt werden, dass die

Produktion von Gelsolin durch Oligodendrozyten im ZNS bei Ratten ihr Maximum während der Bildung von neuen Myelinscheiden erreicht (Lena et al. 1994).

In Kapitel 3.9 ist aus den Diagrammen zu erkennen, dass nicht bei allen Patienten ein Abfall zu sehen ist. Dies könnte daran liegen, dass die Konzentrationsbestimmung zu unterschiedlichen Zeitpunkten während der Inflammationsphase erfolgte. Während es bereits subklinisch zu entzündlichen Veränderungen kommen kann, erfolgt eine Diagnostik erst, wenn sich die Patienten bei klinischer Präsentation von Symptomen vorstellen. Folglich wurde möglicherweise bereits der Talwert erfasst. Zudem sprechen die Ergebnisse von Suhler E et al. 1997 ebenfalls für die oben beschriebene These. Diese zeigten, dass bei einem akuten fulminanten Leberversagen, bei einer Sepsis mit gramnegativen Bakterien und bei einem akuten Myokardinfarkt die Gelsolinkonzentration im Plasma innerhalb von 24 Stunden auf 1/3 der üblichen Konzentration fällt (Suhler et al. 1997). Dies spricht für eine schnelle Dynamik.

Da alle Patienten zum Zeitpunkt des Einschlusses eine klinische Symptomatik boten, damit einen Schub und eine akute Inflammation hatten, ist ein initialer Abfall der Gelsolinkonzentration sehr wahrscheinlich und unterscheidet sich im Ausmaß möglicherweise je nach Intensität der Inflammation. Diese Beobachtung ist von der Diagnose CIS oder MS unabhängig.

Daher lässt sich umgekehrt anhand der Diagramme in Kapitel 3.9 schlussfolgern, dass ein Anstieg der Gelsolinkonzentration im Vergleich zum individuellen Ausgangswert für einen Therapieerfolg sprechen könnte und für ein Sistieren der Inflammation. Der Anstieg erfolgt in einem breiten zeitlichen Rahmen von 6 bis 36 Monaten. Im Umkehrschluss könnte nach Ausschluss anderer Ursachen der verminderten Gelsolinkonzentration, bei fehlendem oder verzögertem Anstieg (z.B. über ein Jahr), trotz klinischer Besserung der Symptomatik, eine erneute Diagnostik durchgeführt werden. Somit könnte möglicherweise eine subklinische Neurodegeneration früher erfasst werden und die Indikation für eine immunmodulierende Therapie großzügiger gestellt werden.
Um dies besser zu verstehen wäre es hilfreich, die Gelsolinkonzentration im Serum nach einem Schub engmaschig zu bestimmen, um die Dynamik besser zu erfassen. Entscheidend wäre zudem, ob der Abfall des individuellen

Ausgangswertes äquivalent zur klinischen Präsentation oder zum Läsionsvolumen ist. Dadurch ließe sich eine bessere Prognose bezüglich des neuronalen Untergangs ableiten. Da bei einigen Patienten die Gelsolinkonzentration im Serum langsamer steigt als bei anderen, wäre es interessant zu überprüfen, ob dies an einer protrahierten Entzündungsreaktion und/oder ein schlechteres Ansprechen auf den ersten Cortisonstoß zurückzuführen ist. Daraus ließe sich möglicherweise die Folgerung ziehen, dass ein fehlender Anstieg der Gelsolinkonzentration eine intensivere Therapie und gegebenenfalls auch eine großzügigere Indikationsstellung für eine immunmodulierende Therapie rechtfertigt.

Zuletzt sind noch die drei CIS Patienten besonders hervor zu heben, die während des Beobachtungszeitraums nicht zu einer MS konvertieren. Dies sind Patient 3 (Abbildung 10) und Patient 8 und 10 (Abbildung 11). Bei diesen Patienten zeigt sich eine tendenziell weniger schwankende Gelsolinkonzentration im Serum. Zudem ist auch der zuvor beschriebene initiale Anstieg weniger oder gar nicht ausgeprägt. Möglicherweise kam es bei diesen Patienten zu einer weniger ausgeprägten Inflammation. Daher ist von einem geringeren Abfall der Gelsolinkonzentration zu Krankheitsbeginn, im Gegensatz zu den konvertierten Patienten, auszugehen. Dies könnte letztlich den fehlenden oder geringer ausgeprägten Anstieg der Gelsolinkonzentration erklären. Als Schlussfolgerung daraus könnte eine konstante Gelsolinkonzentration als prognostisch günstig gewertet werden.

4.5 Zusammenhang zwischen einer immunmodulierenden Therapie und der Gelsolinkonzentration

Es konnten 60 Gelsolinkonzentrationen im Serum von Patienten mit einer immunmodulierenden Therapie und 54 ohne eine immunmodulierende Therapie bestimmt werden. Überprüft wurde, ob eine immunmodulierende Therapie einen Einfluss auf die Gelsolinkonzentration im Serum hat.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigten keinen signifikanten Unterschied der beiden untersuchten Gruppen (p=0,313123).

Dennoch kann gesagt werden, dass in Bezug auf die Gelsolinkonzentration im Serum beide Patientengruppen einen sehr ähnlichen Serumspiegel aufweisen. Bei Patienten, die eine immunmodulierende Therapie erhalten, ist von einer höheren Krankheitsaktivität auszugehen. Deshalb kann die ähnliche Gelsolinkonzentration im Serum auch in einem anderen Licht betrachtet werden. Möglicherweise stellt die immunmodulierende Therapie einen Benefit für die Patienten dar und die Gelsolinkonzentration im Serum würde sich, ohne Therapie, vielleicht bei den beiden Gruppen deutlicher unterscheiden. Interessant wäre diese Hypothese in einer weiteren Arbeit zu hinterfragen. Dies gestaltet sich jedoch schwierig, da zwei weitestgehend homogene Patientengruppen mit einer großen Patientenanzahl nötig wäre, die keine Begleiterkrankungen haben, eine ähnliche demographische Struktur aufweisen, sich zudem in einem ähnlichen Krankheitsstadium befinden und sich dennoch ein Großteil freiwillig gegen eine immunmodulierende Therapie entscheidet.

Außerdem wäre eine Untersuchung bei Patienten mit Fingolimod von großem Interesse, da es einen ähnlichen Wirkmechanismus wie Gelsolin aufweist. In der vorliegenden Arbeit nahm keiner der untersuchten Patienten dieses Präparat, da es zum Untersuchungszeitpunkt noch nicht auf dem Markt war.

Zusammenfassung

Aktuell gibt es wenige Arbeiten, welche die Bedeutung von Gelsolin bei einer chronisch entzündlichen ZNS Erkrankung untersuchen. Auf die Gelsolinkonzentration im Serum nehmen viele Faktoren Einfluss. Gelsolin ist kein „MS-spezifisches“ Protein, dennoch zeigte sich in der vorliegenden Arbeit eine signifikante Reduktion der Gelsolinkonzentration im Liquor bei Patienten mit einer MS im Vergleich zu Patienten mit einem CIS. Dieses Ergebnis ist auch in der bestehenden Literatur wiederzufinden.

Mittels etablierter klinischer und diagnostischer Parameter, die bei der MS Anwendung finden, wurde versucht eine Hypothese zu generieren, inwiefern Gelsolin als Biomarker bei einer MS angewandt werden kann.
Hierzu wurde der Zusammenhang zwischen der Gelsolinkonzentration im Serum und dem EDSS, den T2-Läsionen im cMRT, einem Schubereignis und der

immunmodulierenden Therapie überprüft. Zusätzlich wurde die Gelsolinkonzentration im Serum im Krankheitsverlauf untersucht.
Es konnte anhand der Daten der untersuchten Patientengruppe kein signifikanter Zusammenhang gefunden werden. Hierbei ist die geringe Patientenzahl negativ anzumerken. Zudem wäre eine Korrelation mit dem Läsionsvolumen und/oder kontrastmittelaufnehmender Läsionen vielversprechender gewesen.

In der vorliegenden Arbeit zeigt sich jedoch eine Tendenz der Gelsolinkonzentration im Serum im Krankheitsverlauf. Die Gelsolinkonzentration scheint bei den MS-Patienten bereits zum Zeitpunkt des Einschlusses abgefallen zu sein, oder sie fällt kurz danach ab. Anschließend kommt es bei allen MS-Patienten und fast allen Patienten mit einem CIS im Verlauf zu einem Anstieg der Gelsolinkonzentration über den individuellen Ausgangswert hinaus. Bei diesem Anstieg zeigen sich zeitliche Unterschiede. Hier wäre interessant zu erforschen, warum manche langsamer ansteigen als andere. Möglicherweise ist bei diesen eine protrahierte Inflammation vorhanden. Sollte dies der Fall sein, wäre möglicherweise eine Therapieeskalierung sinnvoll.
Zudem zeigt sich bei den drei untersuchten CIS Patienten, welche nicht zu einer MS konvertierten, eine konstantere Gelsolinkonzentration im zeitlichen Verlauf und kein initialer Abfall. Möglicherweise kam es bei diesen Patienten zu einer weniger ausgeprägten Inflammation und dadurch zu einer geringeren Schwankung der Gelsolinkonzentration im Serum. Somit könnte eine stabile Gelsolinkonzentration im Verlauf, ein prognostisch günstiger Faktor sein.
Eine Untersuchung an Ratten hat gezeigt, dass die Gelsolinkonzentration zum Zeitpunkt des Myelinaufbaus am Höchsten ist (Lena et al. 1994). Möglicherweise gibt es Patienten, die eine bessere Heilungstendenz aufweisen und damit schneller ansteigende Gelsolinkonzentrationen haben. Womöglich sind das diejenigen Patienten, die aufgrund einer besseren intrinsischen Neuroprotektion eine bessere Prognose haben. Sollte dies so sein, wäre ein Gelsolinanstieg ein prognostisch günstiger Faktor.

Zusammenfassend scheint Gelsolin wenig Aussagekraft im Rahmen eines akuten Schubes zu haben, da der Abfall wahrscheinlich sehr schnell erfolgt und nie Ausgangswerte vorliegen.

Jedoch scheint der langsame Anstieg im Verhältnis zum individuellen Ausgangswert und eine konstante Gelsolinkonzentration im Serum im zeitlichen Verlauf ein vielversprechender Ansatz für weitere Untersuchungen zu sein.

Schlussfolgerung:

1. Es zeigt sich ein signifikanter Unterschied der Gelsolinkonzentration im Liquor zwischen MS und CIS Patienten. Die Gelsolinkonzentration im Liquor ist bei Patienten mit MS erniedrigt.
2. Es zeigt sich kein signifikanter Zusammenhang zwischen dem EDSS und der Gelsolinkonzentration im Serum.
3. Es zeigt sich kein signifikanter Zusammenhang zwischen der T2-Läsionslast im cMRT und der Gelsolinkonzentration im Serum.
4. Es zeigt sich kein signifikanter Unterschied der Gelsolinkonzentration bei Patienten mit und ohne immunmodulierender Therapie.
5. Es zeigt sich kein signifikanter Zusammenhang zwischen einem Schubereignis und der zeitlich korrelierten Gelsolinkonzentration im Serum.
6. Folgende Veränderung der Gelsolinkonzentration im Serum konnte im Krankheitsverlauf gesehen werden:

   Bei einigen Patienten zeigt sich ein Abfall. Bei fast allen (18 von 20) zeigt sich nach dem ersten Schubereignis ein langsamer Anstieg der Gelsolinkonzentration im Serum über 6 bis 36 Monate im Verhältnis zum individuellen Ausgangswert. Der Anstieg geschieht unterschiedlich schnell.

   Bei den CIS Patienten die nicht zu einer MS konvertieren, zeigt sich dieser initiale Anstieg weniger oder gar nicht. Zudem haben diese Patienten eine tendenziell konstantere Gelsolinkonzentration im Serum im zeitlichen Verlauf.

5. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit sollte überprüft werden, ob ein Zusammenhang zwischen der Gelsolinkonzentration im Serum und etablierten klinischen und diagnostischen Methoden, welche bei der Multiplen Sklerose (MS) Anwendung finden, besteht. Hieraus sollte wenn möglich eine Hypothese für folgende Arbeiten generiert werden. Folgende Fragen wurden bearbeitet:

1. Besteht ein Zusammenhang zwischen dem Expanded Disability Status Scale (EDSS) und der Gelsolinkonzentration im Serum?
2. Besteht ein Zusammenhang zwischen der T2-Läsionslast in der zerebralen Magnetresonanztomographie (cMRT) und der Gelsolinkonzentration im Serum?
3. Gibt es einen signifikanten Unterschied der Gelsolinkonzentration bei Patienten mit und ohne immunmodulierender Therapie?
4. Zeigt sich ein Zusammenhang zwischen einem Schubereignis und der zeitlich korrelierten Gelsolinkonzentration im Serum?
5. Wie verändert sich die Gelsolinkonzentration im Serum im Krankheitsverlauf?

Für die Untersuchung wurden 22 Patienten, welche sich zwischen 2006 und 2011 in der Neurologie des Universitäts- und Rehabilitationskrankenhauses Ulm befanden, in die Studie aufgenommen. Die Patienten stellten sich mit einer neu aufgetretenen neurologischen Symptomatik in der Klinik vor. In diesem Rahmen erfolgte die diagnostische Erstpunktion des Liquors und Serums. Anschließend erschienen die Patienten in einem Intervall von sechs bis zwölf Monaten zu Visiten. Bei jeder Visite wurden folgende Parameter erfasst, beziehungsweise Befunde erhoben: der EDSS, eine Serumprobe, eine cMRT, ein Schubereignis und eine immunmodulierende Therapie. Insgesamt konnten somit bei allen 22 Patienten 21 Liquorproben und 135 Serumproben gewonnen werden. Die Bestimmung der Gelsolinkonzentration erfolgte mittels Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA). Zudem konnten 124 EDSS, 104 cMRT-Bildgebungen und 44 Schubereignisse erfasst werden. 14 Patienten erhielten während des Beobachtungszeitraums eine immunmodulierende Therapie. Die Patienten befanden sich unterschiedlich lange in der Studie, im Durchschnitt 38 Monaten. Die kürzeste Beobachtungszeit war 14, die längste 63 Monate. Die unterschiedliche Beobachtungszeit und die geringe Patientenzahl sind kritisch zu bewerten. Zudem ist zu erwähnen, dass Gelsolin kein spezifisches Protein ist, in

vielen physiologischen Vorgängen eine Rolle spielt und diversen Einflüssen unterliegt.
Wie in vorhergehenden Untersuchungen war auch bei den hier untersuchten Patienten ein signifikanter Unterschied der Gelsolinkonzentration im Liquor zwischen Patienten mit einer MS und einem klinisch isolierten Syndrom (CIS) zu sehen. So ist die Gelsolinkonzentration im Liquor bei Patienten mit einer MS erniedrigt.

Zu den oben aufgeführten Fragen ergaben sich folgende Ergebnisse:

1. Es zeigt sich kein signifikanter Zusammenhang zwischen dem EDSS und der Gelsolinkonzentration im Serum.
2. Es zeigt sich kein signifikanter Zusammenhang zwischen der T2-Läsionslast im cMRT und der Gelsolinkonzentration im Serum. Wünschenswert wäre eine Korrelation mit dem Läsionsvolumen.
3. Es zeigt sich kein signifikanter Unterschied der Gelsolinkonzentration bei Patienten mit und ohne immunmodulierender Therapie.
4. Es zeigt sich kein signifikanter Zusammenhang zwischen einem Schubereignis und der zeitlich korrelierten Gelsolinkonzentration im Serum. Hierfür verantwortlich ist wahrscheinlich die zu schnelle Dynamik von Gelsolin und der fehlende individuelle Ausgangswert.
5. Folgende Veränderungen der Gelsolinkonzentration im Serum konnte im Krankheitsverlauf gesehen werden:
   Bei einigen Patienten zeigt sich ein Abfall. Bei fast allen zeigt sich nach dem ersten Schubereignis ein langsamer Anstieg der Gelsolinkonzentration im Serum über 6 bis 36 Monate im Verhältnis zum individuellen Ausgangswert. Der Anstieg geschieht unterschiedlich schnell.
   Bei den drei untersuchten CIS Patienten, die nicht zu einer MS konvertieren, zeigt sich eine tendenziell konstantere Gelsolinkonzentration im Serum im zeitlichen Verlauf.

Möglicherweise spricht ein schneller Anstieg für einen Therapieerfolg. Andererseits könnte ein langsamer Anstieg eine Eskalation der Therapie aus neuroprotektiven Aspekten rechtfertigen. Zudem könnte eine konstante Gelsolinkonzentration im Verlauf prognostisch günstig sein.
Dies sind interessante Ansätze für weitere Untersuchungen.

6. Literaturverzeichnis

1. Barkhof F: MRI in multiple sclerosis: correlation with expanded disability status scale (EDSS). Multiple Sclerosis, 5: 283-286 (1999)

2. Brettschneider J, Petzold A, Junker A, Tumani H: Axonal damage markers in the cerebrospinal fluid of patients with clinically isolated syndrome improve predicting conversion to definite multiple sclerosis. Multiple Sclerosis, 12: 143-148 (2006)

3. Brinkmann V, Davis M D, Heise C E, Albert R, Cottens S, Hof R, Bruns C, Prieschl E, Baumruker T, Hiestand P, Foster C A, Zollinger M, Lynch K R: The immune modulator FTY720 targets sphingosine 1-phosphate receptors. Journal of Biological Chemistry, 277: 21453-21457 (2002)

4. Bryan J, Kurth MC: Actin-gelsolin interactions. Evidence for two actin-binding sites. Journal of Biological Chemistry, 259: 7480-7487 (1984)

5. Bucki R, Kulakowska A, Byfield FJ, Zendzian-Piotrowska M, Baranowski M, Marzec M, Winer JP, Ciccarelli NJ, Gorski J, Drozdowski W, Bittman R, Janmey PA: Plasma gelsolin modulates cellular response to sphingosine 1-phosphate. American Journal of Physiology - Cell Physiology, 299: 1516-1523 (2010)

6. Bucki R, Levental I, Kulakowska A, Janmey PA: Plasma gelsolin: function, prognostic value, and potential therapeutic use. Current Protein & Peptide Science, 9: 541-551 (2008)

7. Bucki R, Byfield F J, Kulakowska A, McCormick M E, Drozdowski W, Namiot Z, Hartung T, Janmey P A: Extracellular gelsolin binds lipoteichoic acid and modulates cellular response to proinflammatory bacterial wall components. Journal of Immunology, 181: 4936-4944 (2008)

8. Bucki R, Kulakowska A, Byfield F J, Zendzian-Piotrowska M, Baranowski M, Marzec M, Winer J P, Ciccarelli N J, Gorski J, Drozdowski W, Bittman R, Janmey P A: Plasma gelsolin modulates cellular response to sphingosine 1-phosphate. American Journal of Physiology - Cell Physiology, 299: 1516-1523 (2010)

9. Burtnick LD, Koepf EK, Grimes J, Jones EY, Stuart DI, McLaughlin PJ, Robinson RC: The crystal structure of plasma gelsolin: implications for actin severing, capping, and nucleation. Cell, 90: 661-670 (1997)

10. Burtnick LD, Urosev D, Irobi E, Narayan K, Robinson RC: Structure of the N-terminal half of gelsolin bound to actin: roles in severing, apoptosis and FAF. EMBO Journal, 23: 2713-2722 (2004)

11. Cheng EM, Hays RD, Myers LW, Ellison GW, Beckstrand M, Vickrey BG: Factors related to agreement between self-reported and conventional Expanded Disability Status Scale (EDSS) scores. Multiple Sclerosis, 7: 405-410 (2001)

12. Crayton H, Heyman RA, Rossman HS: A multimodal approach to managing the symptoms of multiple sclerosis. Neurology, 63: S12-8 (2004)

13. Cunningham CC, Stossel TP, Kwiatkowski DJ: Enhanced motility in NIH 3T3 fibroblasts that overexpress gelsolin. Science, 251: 1233-1236 (1991)

14. Dahl B: The extracellular actin scavenger system in trauma and major surgery. Clinical and experimental studies. Acta Orthopaedica, 2 (2005)

15. Dutta R, Trapp B D: Pathogenesis of axonal and neuronal damage in multiple sclerosis. Neurology, 68: S22-31 (2007)

16. Filippi M, Bozzali M, Rovaris M, Gonen O, Kesavadas C, Ghezzi A, Martinelli V, Grossman R I, Scotti G, Comi G, Falini A: Evidence for widespread axonal damage at the earliest clinical stage of multiple sclerosis. Brain, 126: 433-437 (2003)

17. Haddad JG, Harper KD, Guoth M, Pietra GG, Sanger JW: Angiopathic consequences of saturating the plasma scavenger system for actin. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 87: 1381-1385 (1990)

18. Hartung HP, Reiners K, Archelos JJ, Michels M, Seeldrayers P, Heidenreich F, Pflughaupt KW, Toyka KV: Circulating adhesion molecules and tumor necrosis factor receptor in multiple sclerosis: correlation with magnetic resonance imaging. Annals of Neurology, 38: 186-193 (1995)

19. Hemmer B, Cepok S, Nessler S, Sommer N: Pathogenesis of multiple sclerosis: an update on immunology. Current opinion in neurology, 15: 227-231 (2002)

20. Hohlfeld R: Biotechnological agents for the immunotherapy of multiple sclerosis. Principles, problems and perspectives. Brain, 120: 865-916 (1997)

21. Kappos L, Antel J, Comi G, Montalban X, O'Connor P, Polman C H, Haas T, Korn A A, Karlsson G, Radue E W, FTY720 D2201 Study Group: Oral fingolimod (FTY720) for relapsing multiple sclerosis. New England Journal of Medicine, 355: 1124-1140 (2006)

22. Kihara Y, Mizuno H, Chun J: Lysophospholipid receptors in drug discovery. Experimental cell research, 333: 171-177 (2015)

23. Kiselar JG, Janmey PA, Almo SC, Chance MR: Visualizing the Ca2+-dependent activation of gelsolin by using synchrotron footprinting. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 100: 3942-3947 (2003)

24. Koya R C, Fujita H, Shimizu S, Ohtsu M, Takimoto M, Tsujimoto Y, Kuzumaki N: Gelsolin inhibits apoptosis by blocking mitochondrial membrane potential loss and cytochrome c release. Journal of Biological Chemistry, 275: 15343-15349 (2000)

25. Kulakowska A, Ciccarelli NJ, Wen Q, Mroczko B, Drozdowski W, Szmitkowski M, Janmey PA, Bucki R: Hypogelsolinemia, a disorder of the extracellular actin

scavenger system, in patients with multiple sclerosis. BMC Neurology, 10: 107 (2010)

26. Kulakowska A, Drozdowski W, Sadzynski A, Bucki R, Janmey PA: Gelsolin concentration in cerebrospinal fluid from patients with multiple sclerosis and other neurological disorders. European Journal of Neurology, 15: 584-588 (2008)

27. Kurtzke J F: Rating neurologic impairment in multiple sclerosis: an expanded disability status scale (EDSS). Neurology, 33: 1444-1452 (1983)

28. Kwiatkowski DJ, Janmey PA, Yin HL: Identification of critical functional and regulatory domains in gelsolin. Journal of Cell Biology, 108: 1717-1726 (1989)

29. Kwiatkowski DJ, Mehl R, Izumo S, Nadal-Ginard B, Yin HL: Muscle is the major source of plasma gelsolin. Journal of Biological Chemistry, 263: 8239-8243 (1988)

30. Kwiatkowski DJ, Stossel TP, Orkin SH, Mole JE, Colten HR, Yin HL: Plasma and cytoplasmic gelsolins are encoded by a single gene and contain a duplicated actin-binding domain. Nature, 323: 455-458 (1986)

31. Lassmann H, Bruck W, Lucchinetti C: Heterogeneity of multiple sclerosis pathogenesis: implications for diagnosis and therapy. Trends in molecular medicine, 7: 115-121 (2001)

32. Lee WM, Galbraith RM: The extracellular actin-scavenger system and actin toxicity. New England Journal of Medicine, 326: 1335-1341 (1992)

33. Leifeld L, Fink K, Debska G, Fielenbach M, Schmitz V, Sauerbruch T, Spengler U: Anti-apoptotic function of gelsolin in fas antibody-induced liver failure in vivo. American Journal of Pathology, 168: 778-785 (2006)

34. Lena J Y, Legrand C, Faivre-Sarrailh C, Sarlieve L L, Ferraz C, Rabie A: High gelsolin content of developing oligodendrocytes. International Journal of Developmental Neuroscience, 12: 375-386 (1994)

35. Li GH, Arora PD, Chen Y, McCulloch CA, Liu P: Multifunctional roles of gelsolin in health and diseases. Medicinal research reviews, 32: 999-1025 (2012)

36. Li-ChunHsieh K, Schob S, Zeller M W G, Pulli B, Ali M, Wang C, Chiou T T, Tsang Y, Lee P, Stossel T P, Chen J W: Gelsolin decreases actin toxicity and inflammation in murine multiple sclerosis. Journal of neuroimmunology, 287: 36-42 (2015)

37. Liepina I, Czaplewski C, Janmey P, Liwo A: Molecular dynamics study of a gelsolin-derived peptide binding to a lipid bilayer containing phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. Biopolymers, 71: 49-70 (2003)

38. Liu X, Luo Y, Luo Z, Yang H: Biomarker studies in multiple sclerosis: from proteins to noncoding RNAs. Neurochemical research, 39: 1661-1674 (2014)

39. Martin T F: PI(4,5)P(2) regulation of surface membrane traffic. Current opinion in cell biology, 13: 493-499 (2001)

40. McDonald WI, Compston A, Edan G, Goodkin D, Hartung HP, Lublin FD, McFarland HF, Paty DW, Polman CH, Reingold SC, Sandberg-Wollheim M, Sibley W, Thompson A, van den Noort S, Weinshenker BY, Wolinsky JS: Recommended diagnostic criteria for multiple sclerosis: guidelines from the International Panel on the diagnosis of multiple sclerosis. Annals of Neurology, 50: 121-127 (2001)

41. McGough AM, Staiger CJ, Min JK, Simonetti KD: The gelsolin family of actin regulatory proteins: modular structures, versatile functions. FEBS letters, 552: 75-81 (2003)

42. McLaughlin PJ, Gooch JT, Mannherz HG, Weeds AG: Structure of gelsolin segment 1-actin complex and the mechanism of filament severing. Nature, 364: 685-692 (1993)

43. Merkelbach S, Kolmel C, Schimrigk K: [Encephalomyelitis disseminata: clinical aspects, pathogenesis and current therapy concepts]. Radiologe, 40: 1036-1044 (2000)

44. Miller DH, Filippi M, Fazekas F, Frederiksen JL, Matthews PM, Montalban X, Polman CH: Role of magnetic resonance imaging within diagnostic criteria for multiple sclerosis. Annals of Neurology, 56: 273-278 (2004)

45. Miller DH, Weinshenker BG, Filippi M, Banwell BL, Cohen JA, Freedman MS, Galetta SL, Hutchinson M, Johnson RT, Kappos L, Kira J, Lublin FD, McFarland HF, Montalban X, Panitch H, Richert JR, Reingold SC, Polman CH: Differential diagnosis of suspected multiple sclerosis: a consensus approach. Multiple Sclerosis, 14: 1157-1174 (2008)

46. Montalban X, Tintore M, Swanton J, Barkhof F, Fazekas F, Filippi M, Frederiksen J, Kappos L, Palace J, Polman C, Rovaris M, de Stefano N, Thompson A, Yousry T, Rovira A, Miller DH: MRI criteria for MS in patients with clinically isolated syndromes. Neurology, 74: 427-434 (2010)

47. Mounzer K C, Moncure M, Smith Y R, Dinubile M J: Relationship of admission plasma gelsolin levels to clinical outcomes in patients after major trauma. American Journal of Respiratory & Critical Care Medicine, 160: 1673-1681 (1999)

48. Mullauer L, Fujita H, Ishizaki A, Kuzumaki N: Tumor-suppressive function of mutated gelsolin in ras-transformed cells. Oncogene, 8: 2531-2536 (1993)

49. Mullershausen F, Zecri F, Cetin C, Billich A, Guerini D, Seuwen K: Persistent signaling induced by FTY720-phosphate is mediated by internalized S1P1 receptors. Nature Chemical Biology, 5: 428-434 (2009)

50. Nag S, Larsson M, Robinson RC, Burtnick LD: Gelsolin: the tail of a molecular gymnast. Cytoskeleton, 70: 360-384 (2013)

51. Narayan K, Chumnarnsilpa S, Choe H, Irobi E, Urosev D, Lindberg U, Schutt CE, Burtnick LD, Robinson RC: Activation in isolation: exposure of the actin-

binding site in the C-terminal half of gelsolin does not require actin. FEBS letters, 552: 82-85 (2003)

52. Osborn T M, Verdrengh M, Stossel T P, Tarkowski A, Bokarewa M: Decreased levels of the gelsolin plasma isoform in patients with rheumatoid arthritis. Arthritis Research & Therapy, 10: R117 (2008)

53. Patti F, Vila C: Symptoms, prevalence and impact of multiple sclerosis in younger patients: a multinational survey. Neuroepidemiology, 42: 211-218 (2014)

54. Polman CH, Reingold SC, Banwell B, Clanet M, Cohen JA, Filippi M, Fujihara K, Havrdova E, Hutchinson M, Kappos L, Lublin FD, Montalban X, O'Connor P, Sandberg-Wollheim M, Thompson AJ, Waubant E, Weinshenker B, Wolinsky JS: Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2010 revisions to the McDonald criteria. Annals of Neurology, 69: 292-302 (2011a)

55. Polman CH, Reingold SC, Banwell B, Clanet M, Cohen JA, Filippi M, Fujihara K, Havrdova E, Hutchinson M, Kappos L, Lublin FD, Montalban X, O'Connor P, Sandberg-Wollheim M, Thompson AJ, Waubant E, Weinshenker B, Wolinsky JS: Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2010 revisions to the McDonald criteria. Annals of Neurology, 69: 292-302 (2011b)

56. Poser CM, Paty DW, Scheinberg L, McDonald WI, Davis FA, Ebers GC, Johnson KP, Sibley WA, Silberberg DH, Tourtellotte WW: New diagnostic criteria for multiple sclerosis: guidelines for research protocols. Annals of Neurology, 13: 227-231 (1983)

57. Posey SC, Martelli MP, Azuma T, Kwiatkowski DJ, Bierer BE: Failure of gelsolin overexpression to regulate lymphocyte apoptosis. Blood, 95: 3483-3488 (2000)

58. Reiber H, Ungefehr S, Jacobi C: The intrathecal, polyspecific and oligoclonal immune response in multiple sclerosis. Multiple Sclerosis, 4: 111-117 (1998)

59. Schumacher Ga, Beebe G, Kibler Rf, Kurland Lt, Kurtzke Jf, Mcdowell F, Nagler B, Sibley Wa, Tourtellotte Ww, Willmon Tl: PROBLEMS OF EXPERIMENTAL TRIALS OF THERAPY IN MULTIPLE SCLEROSIS: REPORT BY THE PANEL ON THE EVALUATION OF EXPERIMENTAL TRIALS OF THERAPY IN MULTIPLE SCLEROSIS. Annals of the New York Academy of Sciences, 122: 552-568 (1965)

60. Scott L J: Glatiramer acetate: a review of its use in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis and in delaying the onset of clinically definite multiple sclerosis. CNS Drugs, 27: 971-988 (2013)

61. Selchen D, Bhan V, Blevins G, Devonshire V, Duquette P, Grand'Maison F, Kremenchutzky M, Lapierre Y, Li D, von Riedemann SJ, Freedman M: MS, MRI, and the 2010 McDonald criteria: a Canadian expert commentary. Neurology, 79: S1-15 (2012)

62. Silacci P, Mazzolai L, Gauci C, Stergiopulos N, Yin HL, Hayoz D: Gelsolin superfamily proteins: key regulators of cellular functions. Cellular & Molecular Life Sciences, 61: 2614-2623 (2004)

63. Smith DB, Janmey PA, Herbert TJ, Lind SE: Quantitative measurement of plasma gelsolin and its incorporation into fibrin clots. Journal of Laboratory & Clinical Medicine, 110: 189-195 (1987)

64. Suhler E, Lin W, Yin H L, Lee W M: Decreased plasma gelsolin concentrations in acute liver failure, myocardial infarction, septic shock, and myonecrosis. Critical Care Medicine, 25: 594-598 (1997)

65. Tintore M, Rovira A, Rio J, Nos C, Grive E, Sastre-Garriga J, Pericot I, Sanchez E, Comabella M, Montalban X: New diagnostic criteria for multiple sclerosis: application in first demyelinating episode. Neurology, 60: 27-30 (2003)

66. Tremlett H, Zhao Y, Rieckmann P, Hutchinson M: New perspectives in the natural history of multiple sclerosis. Neurology, 74: 2004-2015 (2010)

67. Tumani H, Hartung H, Hemmer B, Teunissen C, Deisenhammer F, Giovannoni G, Zettl U K, BioMS Study Group: Cerebrospinal fluid biomarkers in multiple sclerosis. Neurobiology of disease, 35: 117-127 (2009)

68. Vouyiouklis DA, Brophy PJ: A novel gelsolin isoform expressed by oligodendrocytes in the central nervous system. Journal of neurochemistry, 69: 995-1005 (1997)

69. Wang H, Cheng B, Chen Q, Wu S, Lv C, Xie G, Jin Y, Fang X: Time course of plasma gelsolin concentrations during severe sepsis in critically ill surgical patients. Critical Care (London, England), 12: R106 (2008)

70. Weinshenker B G: The natural history of multiple sclerosis: update 1998. Seminars in neurology, 18: 301-307 (1998)

71. Wright BL, Lai JT, Sinclair AJ: Cerebrospinal fluid and lumbar puncture: a practical review. Journal of neurology, 259: 1530-1545 (2012)

72. Yin HL, Kwiatkowski DJ, Mole JE, Cole FS: Structure and biosynthesis of cytoplasmic and secreted variants of gelsolin. Journal of Biological Chemistry, 259: 5271-5276 (1984)

73. Yin HL, Stossel TP: Control of cytoplasmic actin gel-sol transformation by gelsolin, a calcium-dependent regulatory protein. Nature, 281: 583-586 (1979)

74. Yin H L: Gelsolin: calcium- and polyphosphoinositide-regulated actin-modulating protein. Bioessays, 7: 176-179 (1987)

75. Yu FX, Sun HQ, Janmey PA, Yin HL: Identification of a polyphosphoinositide-binding sequence in an actin monomer-binding domain of gelsolin. Journal of Biological Chemistry, 267: 14616-14621 (1992)

Danksagung

Die Danksagung wurde aus Gründen des Datenschutzes entfernt.

Lebenslauf

Der Lebenslauf wurde aus Gründen des Datenschutzes entfernt.